

Untersuchungen
zum Wirkungsmechanismus von
Lokalanästhetika

Werner Zwez

1970

Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus

von Lokalanästhetika

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von

Werner Zwez

aus

Mittenwald/Karw.

München 1970



Berichterstatter: 1. Professor Dr. H. Schönenberger
2. Professor Dr. Dr. h. c. E. Bamann

Tag der mündlichen Prüfung: 18.11.1970

Meiner lieben Mutter

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1965 bis September 1970 am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München durchgeführt.

Die Anregung zu dieser Arbeit erhielt ich von Herrn Professor Dr. Helmut Schö n e n b e r g e r (Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München) und von Herrn Universitätsdozent Dr. Alfred P e t t e r (Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München).

Für die wissenschaftliche Anleitung und unermüdliche Betreuung bin ich meinen verehrten akademischen Lehrern

Herrn Professor Dr. Helmut Schö n e n b e r g e r

und

Herrn Universitätsdozent Dr. Alfred P e t t e r

zu großem Dank verpflichtet.

Für die hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung elektrophysiologischer Untersuchungen an der Nervenfasern bin ich Herrn Privatdozent Dr. Helmuth M ü l l e r - M o h n s s e n (Gesellschaft für Strahlenforschung mbH. München, Institut für Biologie) zu besonderem Dank verpflichtet.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Professor Dr. Dr. h.c. Eugen B a m a n n für die großzügige Förderung meiner Arbeit und das jederzeit entgegengebrachte Interesse und Wohlwollen.

An dieser Stelle sei mir gestattet, Herrn Professor Dr. Dr. h.c. Karl Z i p f, Vorstand des Institutes für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München für die freundliche Aufnahme in seinem Institut, die große Förderung meiner pharmakologischen Untersuchungen und für seine stete Anteilnahme am Fortgang der Arbeit herzlich zu danken.

Inhaltsübersicht

	Seite
A. Einleitung	1
B. Strukturproteine als Ort der Lokalanästhetika-Wirkung	10
I. Der Ventrikelstreifen des Frosches als Testmodell zur Prüfung von Lokalanästhetika	15
II. Nachweis der unterschiedlichen Wirkung enantiomerer Lokal- anästhetika	22
1. Untersuchungen mit stereoisomeren N-(N-Dimethylphenyl- alanyl)-ephedrinen	22
2. Untersuchungen mit stereoisomeren N-(N-Dimethylalanyl)- und N-(N-Dimethylphenylalanyl)-2, 6-dimethylanilinen	29
III. Zusammenhänge zwischen Lipidlöslichkeit und biologischer Wirkung bei homologen und stereoisomeren Lokalanästhetika...	34
1. Prüfung homologer Cinchocaine	35
2. Prüfung diastereomerer N-(N-Dimethylphenylalanyl)- ephedrine	46
C. Die Beeinflussung des elektrophysiologischen Verhaltens der Mem- bran des Ranvierschen Schnürrings durch stereoisomere N-(N-Dime- thylphenylalanyl)-ephedrine	54
D. Die Bedeutung der verschiedenen Molekülgruppen von Lokalanästheti- ka für die Wechselbeziehung mit Strukturproteinen	62
Wirkungsstudien mit Lokalanästhetika bei verschiedenen pH- Werten	65
a) N-(N-Dimethylalanyl)- und N-(N-Dimethylphenylalanyl)-2, 6-di- methylaniline	68
b) N-(N-Dimethylphenylalanyl)-ephedrine	75
E. Zur Synthese der N-(N-Dimethylphenylalanyl)-ephedrine nach dem Anhydrid-Verfahren	87

I. Untersuchungen zur quantitativen Durchführung der Umsetzung	87
1. Analytische Bestimmung der Einzelkomponenten im Reaktions- gemisch	89
2. Untersuchungen zur Anhydridbildung	91
3. Untersuchungen zur Aminolyse	95
II. Versuche zur stereoselektiven Aminolyse	97
1. Umsetzung von racemischem Anhydrid mit L- ψ -Ephedrin	98
2. Umsetzung von optisch aktivem Anhydrid mit L- ψ -Ephedrin	100
F. Experimenteller Teil	103
I. Bestimmung der Geschwindigkeit der Erregungsleitung im Herz- muskel des Frosches	103
II. Enantiomere N-(Aminoacyl)-2, 6-dimethylaniline	112
1. Synthese	112
2. Prüfung der chemischen Stabilität in wäßriger Lösung	113
3. Bestimmung der Oberflächenaktivität	115
4. Bestimmung des Verteilungskoeffizienten	115
5. Bestimmung der Dissoziationskonstanten	118
6. Bestimmung des Trübungs-pH und der Wasserlöslichkeit	118
III. Synthese diastereomerer N-(Aminoacyl)-ephedrine nach dem Anhydrid-Verfahren (Standardansatz)	121
1. Spektralphotometrische Bestimmung von N-(D, L-N-Dimethylphenylalanyl)-carbäthoxyanhydrid	121
2. Craig-Verteilung	122
3. Bezugssubstanzen für die Dünnschichtchromatographie	123
4. Kinetische Versuche	123
G. Zusammenfassung	126
H. Literaturverzeichnis	128

A. Einleitung

Über den Wirkungsmechanismus der Lokalanästhetika liegen zahlreiche Untersuchungen vor. Sie sind in mehreren Übersichtsarbeiten zusammenfassend dargestellt (1-5).

Folgende Wirkungstheorien werden besonders herausgestellt:

1. Verdrängung von Aktionssubstanzen (z.B. Acetylcholin (6)), welche die Ionenleitfähigkeit der Nervenmembran verändern.

Nach CHANGEUX (7) ist der molekulare Mechanismus dieses Vorgangs den Regulationsprozessen bei allosterischen Proteinen analog. Steuerbare Enzyme und erregbare Membranen besitzen gemeinsame Eigenschaften.

a) Sie sind in dem Sinne "erregbar", daß sie die Bindung einer Aktionssubstanz mit einer charakteristischen Modifikation ihrer biologischen Eigenschaften beantworten, d.h. es wird in einem Fall die enzymatische Aktivität und im anderen die Ionenleitfähigkeit verändert.

b) Sie zeigen komplexe, kooperative Phänomene, wobei die biologische Aktivität von der Schwellenkonzentration der Aktionssubstanz abhängig ist. Diese makromolekularen Strukturen erlangen somit die Eigenschaft eines biologischen Verstärkers. Beiden Eigenschaften werden Regulationsstellen in den steuerbaren Enzymen und Membranen zugeschrieben, die zu einer stereospezifischen Erkennung der Aktionssubstanz und zur Auslösung einer reversiblen Konformationsänderung der makromolekularen Struktur befähigt sind. Sie sind bedingt durch die Organisation der makromolekularen, sich wiederholenden Einheiten des Systems zu hochgeordneten Membranstrukturen.

In Übereinstimmung mit diesen Überlegungen zur Beeinflussung der Ionenleitfähigkeit von Membranen durch Aktionssubstanzen stehen Befunde, die von NACHMANSOHN und Mitarbeitern (6) am Elektrophorus electricus erzielt wurden. Die Wirkung der Lokalanästhetika wird durch diesen Arbeitskreis mit einer Verdrängung der Aktionssubstanz Acetylcholin vom Rezeptor erklärt. Diese Theorie kann aufgrund verschiedener Befunde (2, 18, 21, 31) (besonders wegen der umstrittenen Rolle des Acetylcholins bei der Nervenreizleitung) zur Erklärung der Lokalanästhetika-Wirkung am Nerven nicht herangezogen werden.

2. Hemmung enzymatischer Prozesse, die in einer Beziehung zum aktiven oder passiven Ionentransport stehen.

Es wurde ein Eingriff von Lokalanästhetika in energieliefernde Prozesse der Zelle (z.B. Citratcyclus) beobachtet (8). Solche Vorgänge führen zu einer Beeinträchtigung des aktiven (ATP-abhängigen) Ionentransports. Nach Untersuchungen von KALYANPUR u. RYMAN (9) hemmt Cinchocain darüber hinaus auch die Mg^{++} -abhängige Kationen-Transfer-ATPase des Rattennerven, die für den aktiven Na-K-Transport verantwortlich gemacht wird (vgl. hierzu (10)).

Der passive Ionentransport soll nach RAPP (11) durch Lokalanästhetika über die Blockierung eines Acetylcholin-Kreatinphosphat spaltenden Enzyms gehemmt werden. Damit würde die Bildung der Aktionssubstanz Acetylcholin ausbleiben.

KALYANPUR u. RYMAN (9) nehmen aufgrund ihrer Untersuchungen an, daß der Stoffwechselwirkung von Lokalanästhetika nur eine sekundäre Bedeutung beizumessen ist. Diese Annahme deckt sich, wie in den späteren Ausführungen gezeigt wird, mit den Ergebnissen der Elektrophysiologie.

3. Stabilisierung der Nervenmembran durch Bindung der Lokalanästhetika an Membranstrukturen.

Einer solchen "unspezifischen" Wirkungsweise wird heute von der überwiegenden Zahl der Arbeitskreise der Vorzug gegeben. Sie steht in Übereinstimmung mit den Erkenntnissen der Elektrophysiologie über die Vorgänge der Nervenreizleitung, die in den beiden letzten Jahrzehnten in einer stürmischen Entwicklung erzielt wurden (12-15).

Die Entstehung des elektrischen Impulses in der Nervenfaser ist danach auf zwei Funktionen zurückzuführen (16):

1. Auf die Fähigkeit, mit Hilfe von Stoffwechselenergie ein Ionenungleichgewicht zu erzeugen (Ionenbatterien).
2. Auf die Fähigkeit der Membran, nach einem depolarisierenden Reiz die Ionenleitfähigkeiten für eine kurze Zeit zu verändern (Monostabilität)⁴⁾.

⁴⁾ Unmittelbar nach der Auslösung der Erregung setzt ein spontaner Regenerationsprozeß ein, der die Membran wieder in den erregbaren Ruhezustand zurückführt. Man bezeichnet diese selbstregenerierende Auslösbarkeit als Monostabilität, da das System nur in einer Zustandsform zur Ruhe kommt und der ausgelöste Zustand nur für einen kurzen Zeitabschnitt beständig ist (12, 17).

Lokalanästhetika können in Abhängigkeit von der Konzentration zu einer Blockierung beider Funktionen führen. Ihre Wirkung auf den aktiven Ionentransport (Natrium-Pumpe) - sie tritt erst bei höheren Konzentrationen auf - ist für die Hemmung der Erregungsleitung jedoch ohne Bedeutung.

Die unterschiedliche Beeinflussung des Erregungsvorgangs und des aktiven Ionentransports ist ein starkes Argument dafür, daß beide Vorgänge in räumlich voneinander getrennten Membranbereichen stattfinden.

Der aktive Transport wird durch Stoffwechselgifte wie Dinitrophenol und Cyanide blockiert. Interessant ist, daß solche geschädigten Axone (die Untersuchungen wurden an der Riesennervenfaser des Tintenfisches durchgeführt) noch lange Zeit zur Bildung und Fortleitung von Aktionspotentialen fähig sind (18, 19). Es wurde weiterhin festgestellt, daß man die Riesennervenfaser vollständig auspressen kann und nach Füllung des "Membranschlauches" mit eiweißfreien Elektrolytlösungen wieder eine Funktionsbereitschaft des Präparates erhält (20).

Der Eingriff der Lokalanästhetika in die Erregungsvorgänge ist nach STÄMPFLI (12) ein sehr schneller Vorgang, der in einer Zeit abläuft, in der alle anderen Eingriffe in den intrazellulären Stoffwechsel (21) noch nicht zur Auswirkung kommen. Eine Beeinflussung des aktiven Ionentransports durch Lokalanästhetika würde außerdem zu einem Absinken des Ruhepotentials führen. Es wurde aber beobachtet, daß unter der Einwirkung der Lokalanästhetika (in therapeutischen Konzentrationen) das Ruhepotential der Nervenmembran erhalten bleibt (Stabilisierung der Nervenmembran im Ruhezustand).

Einige Merkmale des passiven und aktiven Kationentransports sind in der folgenden Tabelle aufgeführt (22):

Erregungsvorgang (passiver Ionentransport)	Ionenpumpe (aktiver Ionentransport)
Nettobewegung mit dem elektrischen Gradienten und dem Konzentrationsgefälle	Nettobewegung gegen den elektrischen Gradienten und das Konzentrationsgefälle
Maximaler Ionenflux ca. 20.000 pMol/cm ² · sec	Maximaler Ionenflux 100 pMol/cm ² · sec
Unabhängig vom Zellstoffwechsel	Energieabhängig, durch Stoffwechselgifte hemmbar
Blockierung durch Lokalanästhetika	Lokalanästhetika zeigen in therapeutischen Konzentrationen keinen Einfluß

Aufgrund dieser Ergebnisse konzentrieren sich heute die Bemühungen bei der Erforschung der Lokalanästhetika-Wirkung auf die Eingriffe in passive Ionentransportvorgänge. Die für die Reizleitung verantwortlichen, rein biophysikalischen Erregungsvorgänge, die an der Oberflächenmembran der Nervenfasern ablaufen, sind als der eigentliche Angriffspunkt der Lokalanästhetika anzusehen (12).

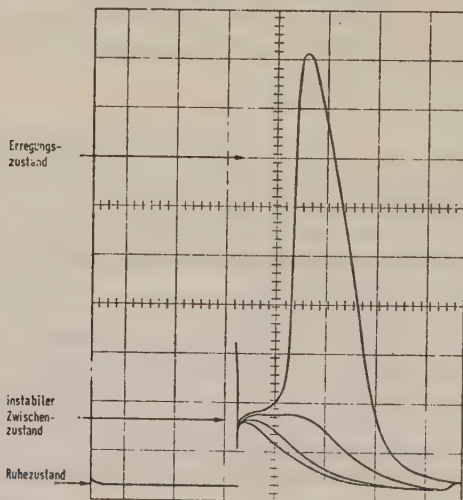


Abb. 1: Aktionspotential eines isolierten Ranvier-Schnürrings. Ein unterschwelliger Reiz führt zum Ruhezustand zurück, ein überschwelliger Reiz löst den Erregungszustand aus (12, 17).

Der Erregungsvorgang ist durch eine Erhöhung der spezifischen Ionenleitfähigkeit für $\text{Na}^{\oplus}$ - bzw. $\text{K}^{\oplus}$ -Ionen charakterisiert. Für den Durchtritt dieser Ionen wird die Existenz spezifisch erregbarer Membranstrukturen angenommen. Man spricht von sogenannten "Natrium- und Kaliumkanälen". Im Ruhezustand sind die Natriumkanäle weitgehend geschlossen und die Kaliumkanäle geöffnet. Die Diffusion der im Innern des Nerven konzentrierten Kaliumionen in den Außenraum bedingt das Ruhepotential (Kaliumdiffusionspotential).

Während der Erregung "öffnen" sich die Natriumkanäle. Ein Teil der außerhalb der Nervenmembran in einer höheren Konzentration vorliegenden Natriumionen strömt ein und bedingt das Aktionspotential (Potentialumkehr). Dieser Vorgang, die "Öffnung" der Natriumkanäle, wird durch Lokalanästhetika selektiv unterbunden (23). Nach der Erregung kommt es zu einem erneuten Verschluß der Natriumkanäle (Monostabilität).

Die beim Erregungsvorgang verzögert einsetzende Öffnung der Kaliumkanäle, die zu einem verstärkten Ausfluß von Kaliumionen und damit zu einer beschleunigten Wiederherstellung des Ruhepotentials führt, wird durch Lokalanästhetika erst in höheren Konzentrationen blockiert (23)

Diesen Vorstellungen entsprechend sind die Natrium- und Kaliumkanäle als die eigentlich erregbaren Strukturen der Nervenmembran anzusehen. Sie erfahren im Augenblick der Erregung eine kurzfristige strukturelle Umwandlung (Konformationsänderung), die zu einer Veränderung ihrer spezifischen Ionenleitfähigkeit führt (24).

Zusammenfassend läßt sich somit sagen, daß die Lokalanästhetika an der Membranaußenseite bevorzugt an Komplementärstrukturen des "Natriumkanals" gebunden werden und mit steigender Konzentration zu einer zunehmenden Blockierung dieser Kanäle und zu einer Herabsetzung der Natriumleitfähigkeit führen. Der wirksamste Eingriff in den Erregungsvorgang ist stets der "Verschluß" der Natriumkanäle.

Das Ruhepotential der Nervenmembran bleibt unter dem Einfluß von Lokalanästhetika unverändert. Bei der Reizung der Membran durch Depolarisationsimpulse unterbleibt die Öffnung der Natriumkanäle. Der Erregungsvorgang ist gehemmt.

Erste Hinweise über die chemische Natur der spezifischen Strukturelemente für den passiven Ionendurchtritt haben Untersuchungen an künstlichen Lipoidmembranen gegeben, die auf überschwellige Reize elektrokinetische Eigenschaften natürlicher Nervenmembranen wie die Bildung von Aktionspotentialen zeigen (25). Diese Fähigkeit bekommen bimolekulare Lipoidmembranen durch Zugabe von EIM⁺, Protaminsulfat und Kaliumsulfat (50 mMol/l) (in eine der beiden die Membran begrenzenden Kammern).

Es wird angenommen, daß EIM-Protamin-Komplexe in die bimolekulare Lipoidmembran eingelagert werden und selektive Durchtrittstellen für Kationen (Kationenkanäle) und Anionen (Anionenkanäle)⁺⁺ enthalten. Die Ionendurchlässigkeit des Komplexes ist abhängig von der Richtung und Stärke des elektrischen Feldes in der Membran

⁺EIM (excitability inducing material) wird aus einer *Aerobacter cloacae* A.T.C.C. 961-Kultur in eiweißhaltigem Medium gewonnen. Es ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von weniger als 100 000.

⁺⁺Nach Untersuchungen von MUELLER u. RUDIN (28) erhöhen makrocyclische Antibiotica wie Valinomycin die Leitfähigkeit von Na^+ und K^+ in bimolekularen Lipoidmembranen in einem unterschiedlichen Ausmaß.

(Bistabilität, Ausbildung von zwei extremen Leitfähigkeitszuständen). Die Rolle des Natriumkanals übernimmt in diesen künstlichen Membranen der Anionenkanal. Aktionspotentiale aufgrund von Änderungen in der Kationen-Anionen-Leitfähigkeit werden z. B. auch bei den Algen *Chara* und *Nitella* beobachtet (25). Der Zusatz von Calciumionen führt an solchen künstlichen Membranen zu einer Erhöhung der Reizschwelle. Auch Cocain blockiert ihre Erregbarkeit reversibel (25).

Die Erregungsvorgänge in der Nervenfasermembran sind aufgrund dieser Untersuchungen an künstlichen Membranen mit großer Wahrscheinlichkeit auf Strukturproteine mit der Funktion von Ionenkanälen beschränkt. Solche Strukturproteine wurden aus verschiedenen Membranen isoliert (26). Sie zeichnen sich durch ihre Unlöslichkeit in Wasser und durch ihre Fähigkeit, Lipide und andere Membraneiweiße zu binden, aus. Die Bindung an Lipide scheint hydrophober Natur zu sein. Es wird angenommen, daß die Strukturproteine brückenartig die beiden Proteinlamellen der Einheitsmembran verbinden. Im Augenblick der Erregung erfahren diese Strukturproteine in der Nervenmembran offenbar eine Konformationsänderung, die zu einer kurzzeitigen, reversiblen Änderung ihrer Leitfähigkeit führt. Parallel dazu erfolgt eine Änderung des Membranpotentials, die durch Ionenflüsse durch die Membran hervorgerufen wird.

Diese Strukturproteine können als Ionenaustauscher angesehen werden, die in ihrem makromolekularen Netz negative Ladungsträger (sog. Festionen, $-\text{COO}^-$ -Gruppen) enthalten. Sie sperren den Durchtritt der Anionen (Ionenpermselektivität). Aus Elektroneutralitätsgründen werden auch Gegenionen zurückgehalten (elektrische Sperrwirkung, Donnan-Sperre) (27). Die unterschiedlichen Elektrolytkonzentrationen innerhalb und außerhalb des Axons sind durch den aktiven Ionentransport bedingt und führen zu einem Dialysepotential. Dieses besteht in erster Linie aus der Differenz der Donnan-Potentiale an den beiden Phasengrenzen und daneben aus dem normalen Diffusionspotential (27) (Abb. 2).

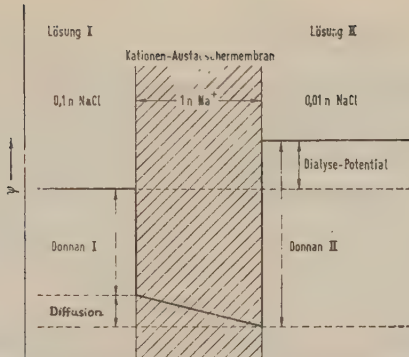


Abb. 2: Schema zum Zustandekommen des Dialysepotentials
(das Diffusionspotential ist in der Zeichnung stark überhöht)
nach SCHMID (27)

Beim Erregungsvorgang wird die Leitfähigkeit der Membran für Natriumionen stark erhöht. Dieser Prozeß ist vermutlich durch eine Konformationsänderung der Strukturproteine bedingt, die zu einer Erniedrigung der Festionenkonzentration in bestimmten Bereichen (Natriumkanäle) führt und so die Donnan-Sperre verringert. Der Anteil des Diffusionspotentials am Dialysepotential wird damit erheblich verstärkt (Freigabe von Diffusionskanälen für Natrium- und Kaliumionen bei der Depolarisation durch Verminderung der Bindung von Calciumionen an der Membranaußenseite). Die einströmenden Natriumionen führen zur Potentialumkehr und zur Bildung des Aktionspotentials.

In der vorliegenden Arbeit werden zwei Probleme zum Wirkungsmechanismus der Lokalanästhetika untersucht:

1. Sind asymmetrisch gebaute Membranstrukturen (Strukturproteine) als Wirkort der Lokalanästhetika anzusehen?
2. Welche Bindungsarten sind bei der Verknüpfung der Lokalanästhetika an komplementäre Membranstrukturen beteiligt?

Eine Klärung dieser Fragestellung ist durch den Einsatz strukturell und sterisch unterschiedlich gebauter Lokalanästhetika bei der biologischen Prüfung möglich.

Zu 1)

a) Wirkung enantiomerer Lokalanästhetika:

Die Annahme von Strukturproteinen als Angriffspunkt der Lokalanästhetika läßt eine unterschiedliche Wirkung enantiomerer Verbindungen erwarten. Ein solcher Wirkungsunterschied wurde bereits von FUCHSBERGER (29) bei stereoisomeren N-(Aminoacyl)-ephedrinen am Nervus ischiadicus des Frosches festgestellt. Für die Prüfung der biologischen Wirkung ist dieses Testobjekt jedoch weniger geeignet, da das Modell Diffusionsbarrieren (Epi-, Peri- und Endoneurium) besitzt. Sie bedingen möglicherweise eine unterschiedliche Diffusion der Enantiomeren, wodurch ein Wirkungsunterschied der Verbindungen vorgetäuscht wird. In dieser Arbeit wurde deshalb als Versuchsobjekt der Ventrikelstreifen des Froschherzens verwendet, der keine nennenswerten Diffusionsbarrieren besitzt.

b) Zusammenhänge zwischen physikalisch-chemischen Eigenschaften und biologischer Wirkung bei homologen und bei diastereomeren Lokalanästhetika:

Bei homologen Lokalanästhetika-Reihen wurde ein symbates Verhalten zwischen Lipidlöslichkeit und biologischer Wirkung beobachtet (30-32). Bei der Annahme einer asymmetrisch gebauten Rezeptorstruktur (Strukturproteine) ist zwar ein symbates Verhalten zwischen Lipidlöslichkeit und biologischer Wirkung bei homologen, nicht jedoch bei diastereomeren Verbindungen zu erwarten.

Zu 2)

Wirkungsstudien mit strukturell und sterisch unterschiedlich gebauten Lokalanästhetika bei verschiedenen pH-Werten:

Die biologische Prüfung von Lokalanästhetika mit unterschiedlicher Konstitution und Konfiguration bei verschiedenen H^+ -Konzentrationen erlaubt einen Einblick in die Bindungsverhältnisse bei der Wechselbeziehung mit Membranproteinen. Ein zunehmender Verlust der Ionenbeziehung (Entladung der protonisierten Aminogruppe) bei steigendem pH-Wert läßt die Bedeutung der Ionenbindung und des hydrophoben Bindungsanteils erkennen. Untersuchungen bei unterschiedlicher H^+ -Konzentration ermöglichen darüber hinaus eine Aussage über die "aktive Wirkform" eines Lokal-

anästhetikums^{†)}.

Auch für die Durchführung der Versuche bei verschiedenen pH-Werten der Testlösung ist der Ventrikelstreifen besonders geeignet. Durch die fehlenden Diffusionsbarrieren werden unterschiedliche Wasserstoffionen- und Wirkstoffkonzentrationen in der Biophase und im Organbad vermieden.

^{†)} In der Literatur wird die Frage nach der Wirkform der N-haltigen Lokalanästhetika ausführlich diskutiert, ohne daß bis heute eine eindeutige Entscheidung zugunsten der freien oder protonisierten Base gefallen ist (1,33, 34).

B. Strukturproteine als Ort der Lokalanästhetika-Wirkung

Im vorhergehenden Kapitel wurden durch Auswertung neuer elektrophysiologischer, pharmakologischer und biochemischer Forschungsergebnisse Vorstellungen zum molekularen Mechanismus der Lokalanästhetika-Wirkung entwickelt, die den Ausgangspunkt zu eigenen Versuchen darstellen. Demzufolge reagieren Lokalanästhetika mit Strukturproteinen der Nervenmembran, die die Funktion von Ionenkanälen erfüllen. Erschwerend für derartige Untersuchungen ist das Fehlen exakter Vorstellungen über den Feinbau der Nervenmembran.

Das am häufigsten diskutierte Membranmodell - die "unit-membrane" - besteht aus einer bimolekularen Lipoidschicht, die als Bausteine Phosphatide und Cholesterin enthält (1, 10). Sie ist von Poren durchsetzt und an ihren polaren Oberflächen durch ionogen gebundene Proteine bedeckt. Diese Vorstellungen werden vor allem durch elektronenmikroskopische Aufnahmen von OsO_4 - behandelten Membranen, z.B. von Myelin, die ein trilaminäres Bild ergeben, gestützt.

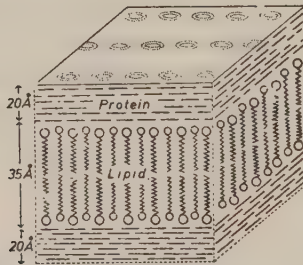


Abb. 3: Aufbau der biologischen Membran nach DAVSON-DANIELLI-ROBERTSON (35).

Es wird angenommen, daß die dunklen Linien von OsO_4 , das an polare Gruppen der Phospholipide und des Proteins gebunden ist, herrühren und daß die elektronentransparenten Bereiche den Fettsäureresten zuzuordnen sind (36). Aufgrund verschiedenartiger Untersuchungsbefunde sind in den letzten Jahren erhebliche Zweifel an der Richtigkeit dieser Vorstellungen laut geworden (36). So zeigen Membranen in elek-

tronenmikroskopischen Aufnahmen auch nach Entfernen der Lipide durch Extraktion eine trilaminäre Struktur.

Die Möglichkeit Phospholipide vom Proteinanteil durch organische Lösungsmittel abzutrennen, deutet zudem darauf hin, daß die Protein-Lipoid-Wechselbeziehung in Membranen nicht wie im vorstehenden Modell durch Ionenbindungen sondern in erster Linie durch hydrophobe Wechselwirkung hervorgerufen wird (37). Eine Instabilität der Membran bei Veränderung der Ionenstärke und des pH, wie sie beim Vorliegen einer Ionenbeziehung anzunehmen wäre, konnte nicht beobachtet werden. Direkte Beweise für die unpolare Wechselwirkung zwischen Proteinen und Lipiden wurden durch IR-, NMR-, ORD- und CD-Messungen erbracht. IR-Spektren weisen auf eine Verdrehung der Kohlenwasserstoffketten der Lipide als Folge einer Assoziation mit Membranproteinen hin (36, 37).

NMR-Spektren zeigen eine merkliche Verbreiterung der Resonanzsignale von $\text{CH}=\text{CH}$, $(\text{CH}_2)_n$ und CH_3 -Protonen, aber nicht von Cholinprotonen; sie wird mit einer hydrophoben Bindung an Proteine erklärt.

Eine solche hydrophobe Wechselwirkung ist im Falle des herkömmlichen Danielli-Modells, in dem das Protein in β -Konformation über die Lipidschicht gespreitet ist, aus sterischen und energetischen Gründen nicht denkbar. Andererseits kann die "unit-membrane"-Struktur des Myelins wegen seines niederen Proteingehaltes nur mit einer β -Konformation in Einklang gebracht werden (36, 37).

Im IR-Spektrum wird die für die β -Konformation charakteristische Lage der gekoppelten $\text{C}=\text{O}$ -Schwingung (Amid I-Bande bei 1630 cm^{-1}) jedoch nicht beobachtet.

Aufgrund von CD-Messungen liegen etwa 50% der Strukturproteine in der α -helikalen Form vor, der Rest ist ungeordnet. Die CD- und die ORD-Spektren zeigen darüber hinaus, daß sich die α -helikalen Abschnitte der Membranproteine in einer relativ hydrophoben Umgebung (Lipide oder α -helikale Proteine) befinden.

Diese zahlreichen Widersprüche führten in den letzten Jahren zur Entwicklung eines Membranmodells, das den Strukturproteinen eine zentrale Stellung einräumt.

Eine wesentliche Stütze für die Proteinnatur der Zellmembran ist die Selektivität der Transportvorgänge (Unterscheidung von Ionen und strukturell oder sterisch verschiedenen Verbindungen).

Nach dem Modell in Abb. 4 besteht die Membran aus Untereinheiten von Strukturproteinen, die ein von Lipidzyklindern durchsetztes Gitter bilden. Die Peptidabschnitte an der Oberfläche sind willkürlich geschlungen ("random coil"), im Inneren der Mem-

bran dagegen α -helikal geordnet. Die α -helikalen Pfeiler sind zu mehreren zusammen gelagert, wobei die hydrophoben Seitenketten nach außen und die hydrophilen Gruppen nach innen gekehrt sind.

Die apolare Außenfläche der Proteinuntereinheiten ist der spezifische Bindungsort für die Kohlenwasserstoffreste der Membranlipide. Man nimmt an, daß das Innere der Proteinuntereinheiten durch die Anwesenheit polarer Gruppen die Funktion von wasserhaltigen Kanälen erhält. Ihre Ionenleitfähigkeit hängt stark vom konformativen Zustand des Proteins ab.

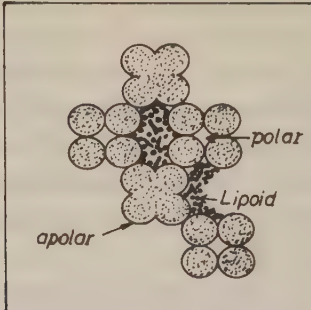


Abb. 4: Schematische Darstellung einer biologischen Membran nach WALLACH (37). Es sind fünf assoziierte Proteineinheiten dargestellt, die sich jeweils aus vier aneinander gelagerten Helices zusammensetzen. Hydrophobe Proteinbezirke stehen mit Kohlenwasserstoffketten der Phosphatide (●) in Wechselwirkung. Die Innenseite der Proteineinheiten ist aus polaren Gruppen aufgebaut. Infolge Hydratisierung bilden sie zentrale Wasserkanäle.

■ = Cholesterin

Die Lipidpfeiler in einer solchen Membran erklären die relative Impermeabilität für nicht lipidlösliche Stoffe, für die keine spezifischen Transportmechanismen existieren und die Durchlässigkeit für lipidlösliche Verbindungen. Es ist anzunehmen, daß Lokalanästhetika sowohl zu einer Einlagerung in die Lipoideinheiten der Membran als auch zu einer Wechselbeziehung mit Strukturproteinen befähigt sind.

ELLICE u. METCALFE (38) konnten durch NMR-Messungen zeigen, daß die eingeschränkte Beweglichkeit von Lipidmolekülen in geordneten Vesikeln durch Lokalanästhetika aufgehoben wird und zu einem Verflüssigungseffekt führt. Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangte McCONNELL (39,40) durch Einführung von freien, stabilen Radikalen ("spin labels") (N-Oxy-4,4-dimethyloxazolidin-Derivat von 5 α -Androstan-3-on-17 β -ol) in die Erythrozytenmembran, wobei diese durch Membranlipide gebunden werden. Er konnte zeigen, daß sich das Resonanzspektrum des "labels" bei Anwesenheit von Lokalanästhetika verändert. Dieser Effekt wird mit einem "Schmelz- oder Verflüssigungsvorgang" der Membranlipide durch die Einwirkung der Lokal-

anästhetika erklärt.

Eine Stabilisierung von Zellgrenzflächen gegen hypotonische Hämolyse beobachtete SEEMAN (41) bei der Einwirkung von Lokalanästhetika in niedrigen Konzentrationen auf Erythrozyten. Zusätzlich wurde eine Schwellung der Membran beobachtet. Beide Phänomene werden durch eine Wechselbeziehung von hydrophoben Molekülanteilen der Lokalanästhetika mit Lipoid- und Lipoproteinschichten gedeutet.

Die Untersuchungen von ELLICE und Mitarbeiter (38), McCONNELL (39, 40) und SEEMAN (41) zeigen, daß Lokalanästhetika mit Membranlipoiden in Wechselwirkung treten. Die Bedeutung dieses Vorgangs für die Wirkung der Lokalanästhetika bleibt jedoch offen, solange keine quantitativen Zusammenhänge zwischen der leitungshemmenden Wirkung und der Lipoid-Wechselbeziehung bei Lokalanästhetika-Reihen bekannt sind (untersucht mit den erwähnten speziellen Methoden).

Über die Wechselbeziehung mit Strukturproteinen der Membran, dem vermutlich wesentlichen Vorgang der Lokalanästhetika-Wirkung (vgl. S. 6), liegen keine Angaben vor. Für den Nachweis einer solchen Wechselbeziehung sind optisch aktive Lokalanästhetika besonders geeignet. Eine unterschiedliche Wirkung enantiomerer Lokalanästhetika deutet auf eine Bindung an asymmetrisch gebaute Strukturproteine hin.

Nach der Theorie von EASSON u. STEDMAN (42) entfaltet ein asymmetrisch gebauter Arzneistoff dann die bestmögliche Wirkung, wenn die Zuordnung des Wirkstoffes an den Rezeptor über eine Drei-Punkte-Beziehung erfolgt. Sie kann durch verschiedene Bindungsarten (s. S. 62) zustande kommen. Das asymmetrische C-Atom nimmt mit seinen drei Liganden A, B und C aufgrund passender räumlicher Struktur Beziehung zu den Rezeptorstellen A', B' und C' auf. Der optische Antipode kann wegen seines spiegelbildlichen Baus lediglich zwei Bindungen betätigen. Infolge der fehlenden Bindung C-C' resultiert eine geringere Stabilität des Arzneistoff-Rezeptor-Komplexes und damit eine Wirkungsminderung (Abb. 5).

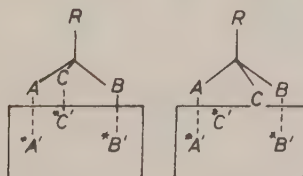


Abb. 5: Wechselbeziehung eines enantiomeren Wirkstoffes mit Rezeptoren nach EASSON u. STEDMAN (42)

Für eine solche Wechselwirkung kommen bei N-haltigen Lokalanästhetika, z. B. bei Diäthylamino-2, 6-dimethyl-acetanilid (Lidocain, Xylocain[®]), als verknüpfende Molekülgruppierungen aliphatische oder aromatische Reste (hydrophobe Wechselbeziehung) und die protonisierte Aminogruppe (Ionenbeziehung) in Betracht.

I. Der Ventrikelstreifen des Frosches als Testmodell zur Prüfung von Lokalanästhetika

Zum Nachweis des lokalanästhetischen Effektes und zur Ermittlung der klinischen Brauchbarkeit einer Verbindung ist eine Vielzahl von Testmethoden üblich (43). Die mit verschiedenen Verfahren erzielten Ergebnisse sind in der Regel nicht vergleichbar. Sogar die mit einer Methode erzielten Befunde lassen sich bei einigen Verfahren nur schwer reproduzieren. So streuen z. B. die in der Literatur angegebenen Werte für die Wirksamkeit von Diäthylamino-2, 6-dimethyl-acetanilid (Lidocain) bei der Infiltrations- und Leitungsanästhesie zwischen 1 und 4 bzw. 2 und 4 bezogen auf Procain (= 1). Eine besonders unterschiedliche Wirkungsstärke zeigt Lidocain bei der Oberflächenanästhesie an der Kaninchencornea. Hier schwankt die relative Wirksamkeit zwischen 2 und 21, 6.

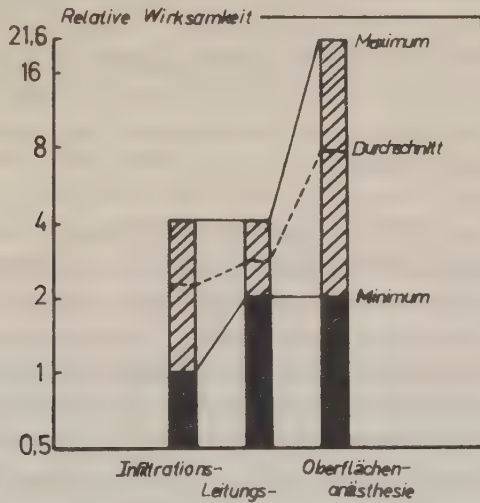


Abb. 6: Überblick über die in der Literatur angegebenen Werte für die Wirksamkeit von Lidocain bezogen auf Procain = 1 (57)

- Minimalwerte
- Maximalwerte

Die divergierenden Ergebnisse, die sich insbesondere auch durch Benutzung verschiedenartiger Testobjekte ergeben, veranlaßten HERR (43) Standardmethoden zu entwickeln. Er schlägt vor, zur Messung der Infiltrations- und Leitungsanästhesie die Rattenschwanz-Methode und zur Bestimmung der Oberflächenanästhesie die Cornea-Methode am Meerschweinchen anzuwenden.

Für Untersuchungen, die Zusammenhänge zwischen Konstitution oder Konfiguration und lokalanästhetischer Wirkung behandeln, bedarf die Wahl der biologischen Testmethode einer besonderen Sorgfalt. So muß bei Versuchen am Ganztier, z. B. bei der Infiltrationsanästhesie, mit einer Beeinflussung der Ergebnisse durch einen unterschiedlich schnellen enzymatischen Abbau der enantiomeren Verbindungen gerechnet werden (29). Die intracutane Verabreichung der Testlösung kann weiterhin zur Verschiebung des osmotischen und ionalen Gleichgewichtes in der Nervenumgebung führen und so die Reizleitung stören. Dadurch wird ein nicht spezifischer anästhetischer Effekt festgestellt (43). Ebenso wie die Bestimmung der Infiltrationsanästhesie am Meerschweinchen scheidet für unsere Untersuchungen mit stereoisomeren Lokalanästhetika der Test an der Kaninchencornea (Oberflächenanästhesie) aus. Eine pH-Änderung bzw. eine Verdünnung durch Augenflüssigkeit (Irritation) kann eine unterschiedliche Wirkung vortäuschen.

Wir entschieden uns deshalb für Versuche am isolierten Organ. Hierbei eignet sich der viel verwendete Froschischadicus nur bedingt, da der Wirkstoff durch Bindegewebsstrukturen (Epi-, Peri- und Endoneurium) diffundieren muß (Abb. 7), um zu den reaktiven Stellen in der Membran der Nervenfasern zu gelangen (44). So lassen sich beispielsweise am Ischiadicus-Gastrocnemius Präparat bei Verwendung einer 0,2%igen Lösung von N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-D-ephedrin noch nach 83 Min. Kontraktionen am innervierten Muskel auslösen. Bei Prüfung schwächerer Wirkstofflösungen ergeben sich wesentlich längere Zeiten bis zum Wirkungseintritt (Leitungsblock) (29). Die Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Kurve wird dadurch erheblich erschwert.

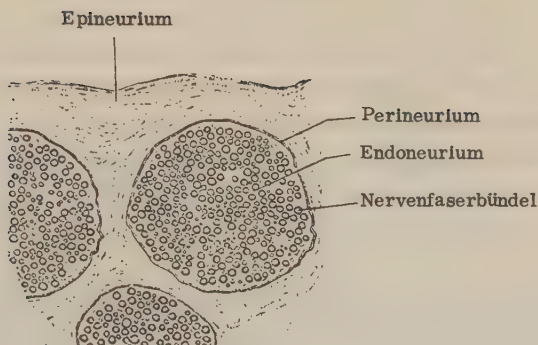


Abb. 7: Querschnitt durch einen markhaltigen Nerv (45).

Die Hüllen, besonders die Endoneuralscheide stellen für die meisten Ionen und viele Wirkstoffe Diffusionshindernisse dar. Aber auch das Perineurium ist eine beträchtliche Penetrationsbarriere (44).

Das Bindegewebe besteht aus Schichten von Lipoiden und Proteinen. Die asymmetrisch gebauten Schichten beeinflussen die Permeation von optischen Isomeren wahrscheinlich unterschiedlich. Wiederholt sich der Vorgang an vielen derartigen Grenzflächen, so können Trenneffekte auftreten, die zu verschiedenen Konzentrationen der Enantiomeren am Wirkort und damit zu Wirkungsunterschieden führen (46).

Für Struktur-Wirkungsuntersuchungen ist daher eine Prüfung an isolierten Organen, die keine bindegewebigen Strukturen (Diffusionsbarrieren) besitzen, erforderlich. Ein solches Versuchsobjekt ist der Ventrikelstreifen des Froschherzens, der in dieser Arbeit zur Prüfung von Lokalanästhetika verwendet wird. Ein wesentlicher Vorzug dieser von BAMMER u. ROTHSCUH (47) beschriebenen Methode besteht darin, daß der Einfluß des Pharmakons direkt an der erregbaren Membran untersucht werden kann. Gemessen wird die Leitungsgeschwindigkeit der Erregung bei Einwirkung der Prüfsubstanz. Die Empfindlichkeit dieser Methode liegt weit höher als beim Froschischiodicus. Sie gestattet außerdem eine Testung bei unterschiedlichen pH-Werten (s.S. 65).

Die Untersuchungen der letzten Jahre haben ergeben, daß sich die verschiedenen erregbaren Membranen in ihrem Feinbau und ihrer strukturellen Zusammensetzung nicht sehr wesentlich voneinander unterscheiden. Auch sprechen viele Beobachtungen dafür, daß die Erregungsvorgänge in den verschiedenen Fasertypen nach denselben Elementarmechanismen ablaufen (48-50). Insbesondere durch Tetrodotoxin (TTX)⁺⁾, das an verschiedenen erregbaren Strukturen selektiv den schnellen $\text{Na}^{\oplus}$ -Einstrom hemmt, konnte gezeigt werden, daß die Mechanismen der Erregung an der Herzmuskelzelle und an der Nervenfaser grundsätzlich übereinstimmen (48).

Eine Besonderheit der Herzmuskulatur ist ihr syncytialer Zusammenhang (10, 45). Sie stellt ein längsgestrecktes Netzwerk dar, in dem die Einzelfasern durch Glanzstreifen (Disci intercalares) unterbrochen werden (Abb. 9). Aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen geht hervor, daß diese Glanzstreifen enge Berührungsflächen zweier Zellmembranen darstellen (Abb. 9 u. 10). Hieraus ergibt sich, daß der Herzmuskel aus Einzelzellen aufgebaut ist. Neuere Ergebnisse der Elektrophysiologie haben gezeigt, daß die Glanzstreifen dem Ionenstrom nur einen geringen Widerstand entgegensetzen (51); die benachbarten Zellen sind elektrisch miteinander verbunden und bilden eine funktionelle Einheit (52). Demnach kann der Herzmuskel (analog zur Nervenfaser) als ein langer Kernleiter mit leitendem Myoplasma (Neuroplasma) aufgefaßt werden.

^{+) TTX, ein Gift des japanischen Pufferfisches Fugu, blockiert noch in einer Konzentration von 10^{-7} - 10^{-9} Mol/l den "Natriumkanal".}



Abb. 8: Längsschnitt durch den Herzmuskel (53)
 mel = Herzmuskelement
 k = Zellkern der Muskelfaser
 gl = Glanzstreifen

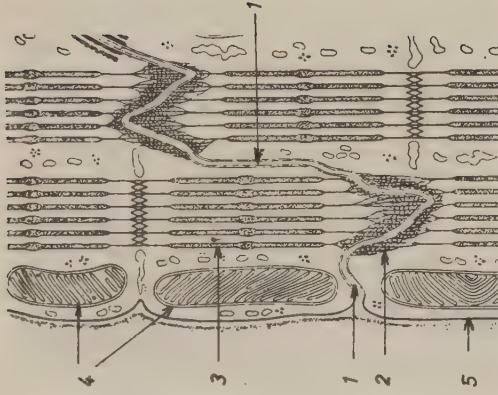


Abb. 9: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Längsschnitts durch zwei Herzmuskelzellen im Bereich eines Glanzstreifens (Discus intercalaris) (54)
 1 = Glanzstreifen
 2 = Verankerung der Filamentendigungen
 3 = Myofibrille
 4 = Mitochondrien
 5 = erregbare Membran der Herzmuskelzelle

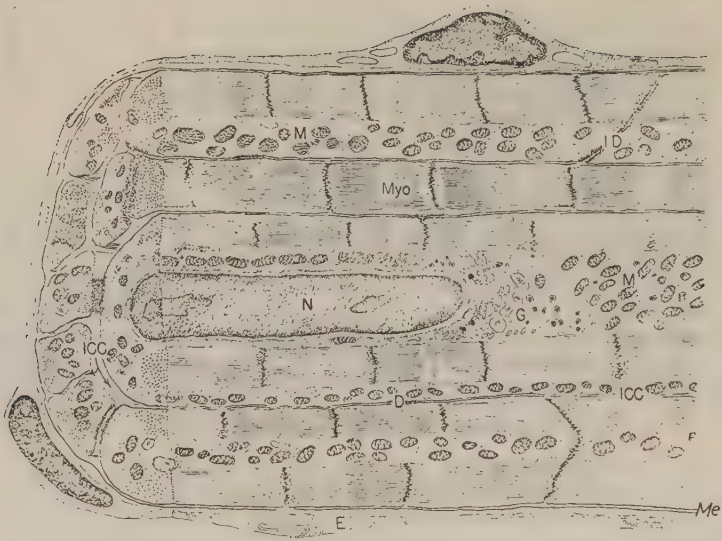


Abb. 10: Räumliches Modell einer Herzmuskelfaser vom Frosch (55)

ID = Glanzstreifen

Myo = Myofibrillen

M = Mitochondrien

N = Nucleus

Me = Erregbare Membran der Herzmuskelfaser

ICC = Interzellulärer Spalt

E = Endothel

D = Desmosomen

G = Golgi-Apparat

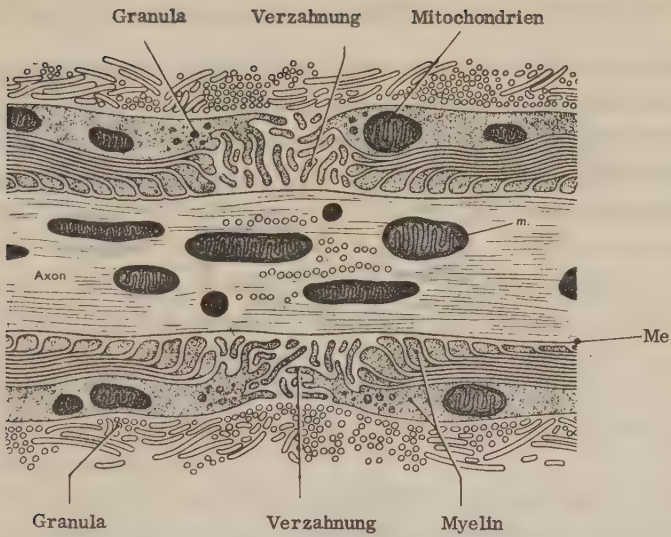


Abb. 11: Schematische Darstellung einer einzelnen Nerven-
faser im Bereich eines Internodiums (18)

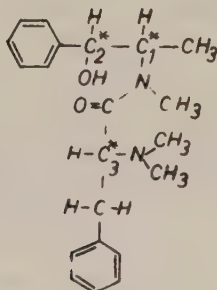
Me = erregbare Membran der Nervenfaser

m= Mitochondrien

II. Nachweis der unterschiedlichen Wirkung enantiomerer Lokalanästhetika

1. Untersuchungen mit stereoisomeren N-(N-Dimethylphenylalanyl)-ephedrinen

Zur Beantwortung der Frage, ob es sich bei der Wirkung der Lokalanästhetika um die Reaktion mit einer asymmetrischen Struktur der Nervenzellmembran handelt, wurden von BRINKMANN (56) stereoisomere N-(N-Dimethylphenylalanyl)-ephedrine synthetisiert und an der Kaninchencornea, sowie an der Meerschweinchenquaddel auf ihre Wirkung geprüft.



- | | |
|--|---------------------|
| 1a) N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-D-ephedrin | (LD) |
| 2a) N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-L-ephedrin | (LL) |
| 3a) N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-D-ψ -ephedrin | (LD ψ) |
| 4a) N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-L-ψ -ephedrin | (LL ψ) ⁺ |
| 1b) N-(D-N-Dimethylphenylalanyl)-L-ephedrin | (DL) |
| 2b) N-(D-N-Dimethylphenylalanyl)-D-ephedrin | (DD) |
| 3b) N-(D-N-Dimethylphenylalanyl)-L-ψ -ephedrin | (DL ψ) |
| 4b) N-(D-N-Dimethylphenylalanyl)-D-ψ -ephedrin | (DD ψ) |

N-(N-Dimethylphenylalanyl)-ephedrin besitzt drei asymmetrische C-Atome, es tritt in acht stereoisomeren Formen auf, die sich in die Gruppe der L-N-Dimethylphenylalanin-Derivate (1a, 2a, 3a und 4a) und in die der D-N-Dimethylphenylalanin-Deriva-

⁺) (+)-ψ -Ephedrin wird in Anlehnung an die Arbeit von S. IKUMA [J. Pharmac. Soc. Japan 75, 52-53 (1955); ref. C.A. 50, 868 g] als L(+)-ψ -Ephedrin [L(+)-threo-1-Phenyl-2-methylaminopropanol(1)] bezeichnet. Das Vorzeichen L ergibt sich aus Untersuchungen von H. EMDE (Arch. Pharmaz. 268, 90 (1930)) und K. FREUDENBERG [Liebigs Ann. Chem. 510, 223 (1934)], die (+)-ψ -Ephedrin zu L(+)-Alanin und L(+)-Mandelsäure in Beziehung bringen konnten.

te (1b bis 4b) aufteilen lassen. Die Verbindungen 1a/1b, 2a/2b, 3a/3b und 4a/4b verhalten sich zueinander wie Bild und Spiegelbild.

Die Wirkung der stereoisomeren N-(N-Dimethylphenylalanyl)-ephedrine auf die Geschwindigkeit der Reizfortleitung (LG) wurde am Ventrikelstreifen bei pH 7,3 bestimmt. Die vier geprüften Antipodenpaare zeigten eine unterschiedliche Hemmung der LG. Sie nahm in allen untersuchten Fällen mit der Einwirkungsdauer ab, bis die maximale Hemmwirkung erreicht war. Um die Wirkung der einzelnen Enantiomeren vergleichen zu können, wurde aus einer Reihe von Hemmstoffkonzentrationen jene ermittelt, die nach 30 Min. Einwirkungszeit die LG um 50% hemmte (Tab. 1). Der Verlauf der LG-Abnahme unter der Wirkung von LD/DL, LL/DD, LD Ψ /DL Ψ und LL Ψ /DD Ψ ist in der Tab. 11 (s. experiment. Teil S.105) wiedergegeben. In den Abbildungen 12 und 13 sind am Beispiel der Verbindungen LD und DL die prozentualen Änderungen der LG graphisch dargestellt. Die zugehörige Dosis-Wirkungskurve ist in Abb. 14 wiedergegeben.

Die hier festgestellten statistisch signifikanten Wirkungsunterschiede der Enantiomerenpaare wurden bereits an anderen Testobjekten beobachtet (29, 56). Im Vergleich zu den früheren Untersuchungen, die am N. ischiadicus eine stärkere Wirksamkeit der im Aminosäureanteil L-konfigurierten Verbindungen (1a bis 4a) ergaben, konnte am Ventrikelstreifen mit Ausnahme von LL/DD eine stärkere Beeinflussung durch die Enantiomeren der D-N-Dimethylphenylalanin-Reihe festgestellt werden (Abb. 15). Dieser gegensätzliche Befund kann begründet liegen

1. in einer unterschiedlichen Membranstruktur beider Testorgane
(Organspezifität)

2. in der Anwesenheit von Diffusionsbarrieren am N. ischiadicus (s. S. 15).

Die Wirkungsunterschiede der enantiomeren N-(N-Dimethylphenylalanyl)-ephedrine bestätigen unsere Annahme, daß Lokalanästhetika mit Strukturproteinen in der Membran in Wechselwirkung treten und so zu einer Blockierung der Reizleitung führen.

Tab. 1: Hemmung der Erregungsleitung im Ventrikelstreifen des Froschherzens durch enantiomere N-(Aminoacyl)-ephedrine

Wirkstoff	Test-pH	ID ₅₀ [µMol/l]
1a) N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-D-ephedrin (LD)	7,3	140,0
b) N-(D-N-Dimethylphenylalanyl)-L-ephedrin (DL)	7,3	72,0
2a) N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-L-ephedrin (LL)	7,3	35,0
b) N-(D-N-Dimethylphenylalanyl)-D-ephedrin (DD)	7,3	62,0
3a) N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-D-ψ-ephedrin (LDψ)	7,3	96,0
b) N-(D-N-Dimethylphenylalanyl)-L-ψ-ephedrin (DLψ)	7,3	78,0
4a) N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-L-ψ-ephedrin (LLψ)	7,3	200,0
b) N-(D-N-Dimethylphenylalanyl)-D-ψ-ephedrin (DDψ)	7,3	102,0

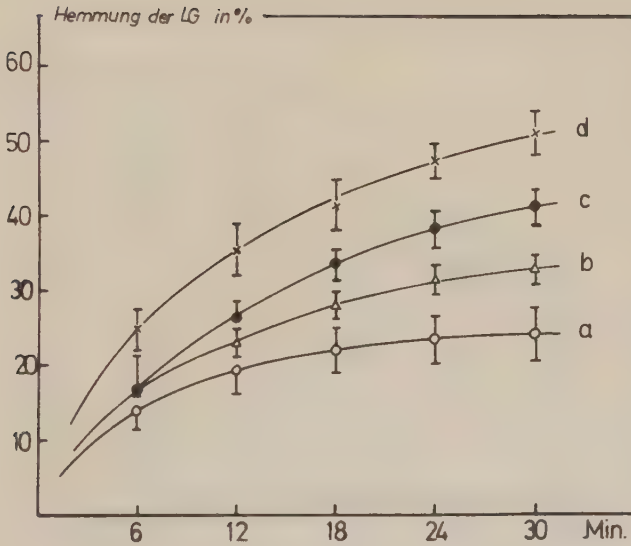


Abb. 12: Zeit-Wirkungskurve:

Prozentuale Änderung der Erregungsleitungsgeschwindigkeit LG (cm/sec)
unter der Wirkung von LD bei pH 7,3

a: 50 $\mu\text{Mol/l}$

b: 74 $\mu\text{Mol/l}$

c: 100 $\mu\text{Mol/l}$

d: 145 $\mu\text{Mol/l}$

Abszisse: Einwirkungszeit in Minuten

Ordinate: Prozentuale Änderung der LG gegenüber dem
Ausgangswert

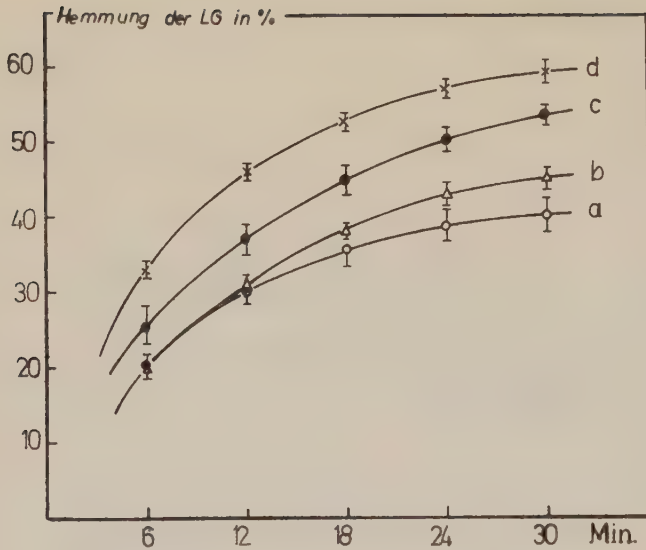


Abb. 13: Zeit-Wirkungskurve:

Prozentuale Änderung der Erregungsleitungsgeschwindigkeit LG (cm/sec)
unter der Wirkung von DL bei pH 7,3

a: 50 $\mu\text{Mol/l}$

b: 60 $\mu\text{Mol/l}$

c: 80 $\mu\text{Mol/l}$

d: 100 $\mu\text{Mol/l}$

Abszisse: Einwirkungszeit in Minuten

Ordinate: Prozentuale Änderung der LG gegenüber dem
Ausgangswert

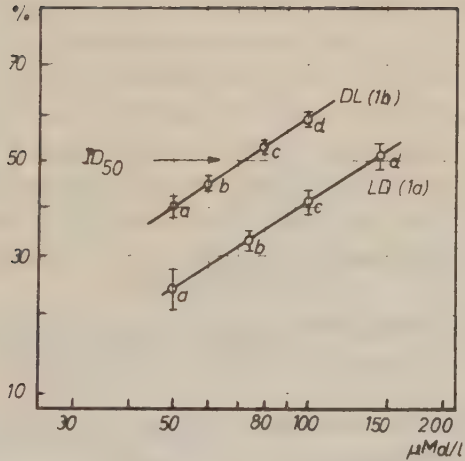


Abb. 14: Dosis-Wirkungsbeziehung: Quantitative Beziehung zwischen der Hemmstoffkonzentration und dem 30 Min.-Wirkungsprozentwert bei pH 7,3 unter der Einwirkung von LD und DL. Molare Konzentration wie in Abb. 12 u. 13

Abszisse: Log. der molaren Konzentration

Ordinate: Prozentuale Änderung der LG gegenüber dem Ausgangswert nach 30 Min. Einwirkungszeit;
Hazen-Skala im Wahrscheinlichkeitsnetz

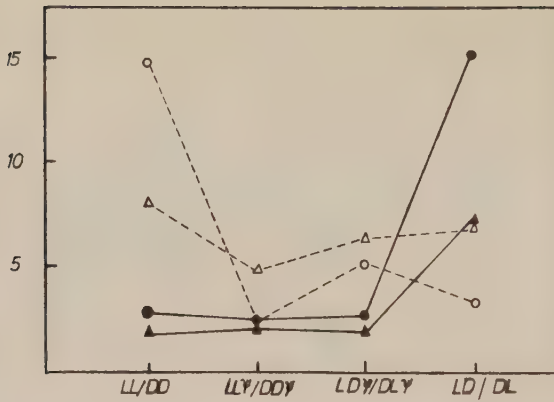


Abb. 15: Wirkung der stereoisomeren N-(N-Dimethylphenylalanyl)-ephedrine am N. ischiadicus (—), $30/c_m [\mu\text{Mol/l}]^{-1}$ und am Ventrikelstreifen des Frosches (-----), $500/ID_{50} [\mu\text{Mol/l}]^{-1}$

●—● N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-ephedrine
 ○-----○
 ▲—▲ N-(D-N-Dimethylphenylalanyl)-ephedrine
 △-----△

Abszisse: Enantiomere N-(Aminoacyl)-ephedrine

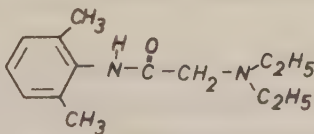
Ordinate: Reziproke Wirkungsstärke

2. Untersuchungen mit stereoisomeren N-(N-Dimethylalanyl)- und N-(N-Dimethylphenylalanyl)-2, 6-dimethylanilinen

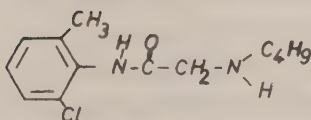
Gleichartige Untersuchungen zum Nachweis einer Wechselwirkung von Lokalanästhetika mit Strukturproteinen wurden mit enantiomeren N-(N-Dimethylalanyl)- und N-(N-Dimethylphenylalanyl)-2, 6-dimethylanilinen durchgeführt.

Die Anwesenheit von nur einem Asymmetriezentrum in diesen Verbindungen erleichtert Modellbetrachtungen zur Wechselbeziehung der Lokalanästhetika mit Strukturproteinen. Strukturell schließen sich diese Stoffe eng an die bekannten Lokalanästhetika Lidocain (Xylocain[®]) und Butacetoluid (Hostacain[®]) an. Die gute Wirkung des Lidocains und die Stabilität seiner -CO-NH-Gruppe gegen hydrolytische Spaltung beruht auf der Anwesenheit von zwei CH₃-Resten in den Positionen 2 u. 6 des Anilins (57, 58).

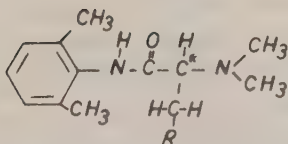
Diese Eigenschaften sind auch bei den stereoisomeren N-(N-Dimethylalanyl)- und N-(N-Dimethylphenylalanyl)-2, 6-dimethylanilinen zu erwarten.



Lidocain

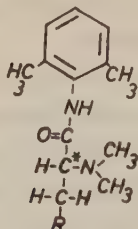


Butacetoluid



N-(Aminoacyl)-2,6-dimethylanilin

Zur Herstellung dieser Verbindungen werden die optisch aktiven N-Dimethylalanine für 1a/1b und N-Dimethylphenylalanine für 2a/2b mit Chlorameisensäureäthylester in die gemischten Anhydride übergeführt. Aus diesen werden durch weitere Umsetzung mit 2,6-Dimethylanilin die entsprechenden N-(Aminoacyl)-2,6-dimethylaniline gewonnen:



1a, 1b R = H

2a, 2b R = C₆H₅

1a) N-(D-N-Dimethylalanyl)-2,6-dimethylanilin (D-Ala-A)

1b) N-(L-N-Dimethylalanyl)-2,6-dimethylanilin (L-Ala-A)

2a) N-(D-N-Dimethylphenylalanyl)-2,6-dimethylanilin (D-Phe-A)

2b) N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-2,6-dimethylanilin (L-Phe-A)

Die biologische Prüfung der beiden Enantiomerenpaare erfolgte am Ventrikelstreifen des Froschherzens. Bestimmt wurde die inhibitorische Dosis 50 (ID₅₀) bei den pH-Werten, bei welchen die N-(Aminoacyl)-2,6-dimethylaniline zu gleichen Teilen als freie und protonisierte Basen vorliegen (Abb. 16 u. Tab. 2). Da sich beide Molekülformen in ihrer Wirkung deutlich unterscheiden (s. S. 68), ist nur unter solchen Voraussetzungen ein Vergleich der Verbindungen 1a/1b mit 2a/2b möglich.

Die biologische Prüfung der enantiomeren N-(N-Dimethylalanyl)- und N-(N-Dimethylphenylalanyl)-2,6-dimethylaniline führte zum gleichen Ergebnis wie die Versuche mit N-(N-Dimethylphenylalanyl)-ephedrinen. Auch bei diesen Verbindungen zeichnen sich die spiegelbildlich gebauten Enantiomere durch eine verschieden starke Hemmung der LG im Ventrikelstreifen aus (Tab. 2). Die ausgeprägten Wirkungsunterschiede können nur mit einer Wechselbeziehung der optisch aktiven Lokalanästhetika-Moleküle mit asymmetrisch gebauten Strukturen (Proteinen) in den Membranen der Herzmuskelzellen gedeutet werden. Interessanterweise zeigt vom Antipodenpaar 1a/1b die D-konfigurierte Verbindung eine mehr als 3-fach stärkere Wirkung im Vergleich zum L-konfigurierten Isomer. Im Falle der enantiomeren N-(N-Dimethylphenylalanyl)-

Tab. 2: Hemmung der Erregungsleitung im Ventrikelstreifen des Froschherzens durch enantiomere N-(Aminoacyl)-2, 6-dimethylaniline

Wirkstoff	Test-pH =p' K _a	ID ₅₀ [μMol/l]
1a) N-(D-N-Dimethylalanyl)-2, 6-dimethylanilin	7, 03	85, 0
1b) N-(L-N-Dimethylalanyl)-2, 6-dimethylanilin		260, 0
2a) N-(D-N-Dimethylphenylalanyl)-2, 6-dimethylanilin	6, 49	58, 0
2b) N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-2, 6-dimethylanilin		24, 0

2,6-dimethylaniline 2a/2b beeinträchtigt dagegen die L-konfigurierte Verbindung die LG stärker. Der Vergleich der vier N-(Aminoacyl)-2,6-dimethylaniline untereinander ergibt die Wirkungsreihe 2b>2a>1a>1b, womit die N-(N-Dimethylalanyl)-2,6-dimethylaniline (1a/1b) sich durch eine vergleichsweise geringere Beeinflussung der LG auszeichnen.

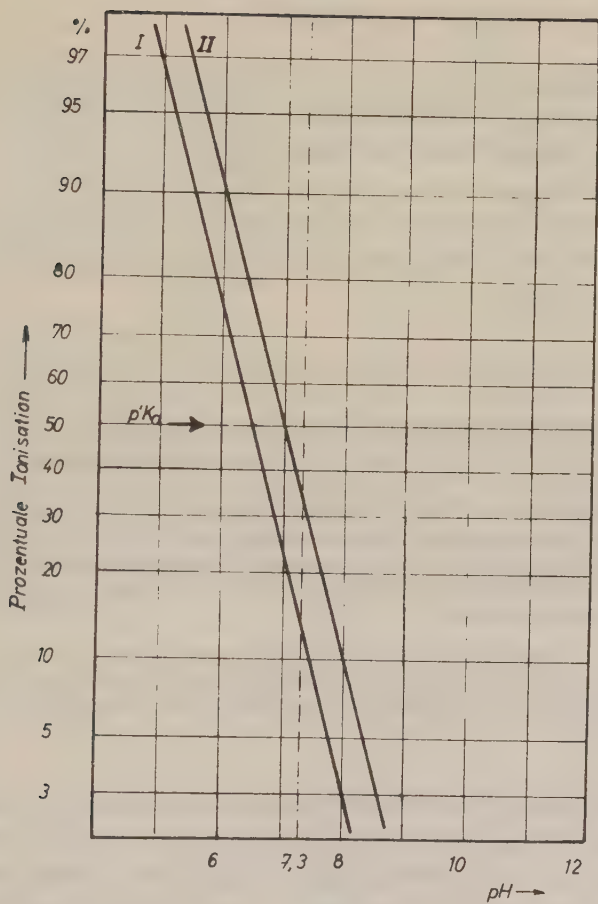


Abb. 16: Beziehung zwischen pH und Ionisationsgrad der N-(Aminoacyl)-2,6-dimethylaniline

I: N-(D, L-N-Dimethylphenylalanyl)-2,6-dimethylanilin

II: N-(D, L-N-Dimethylalanyl)-2,6-dimethylanilin

III. Zusammenhänge zwischen Lipidlöslichkeit und biologischer Wirkung bei homologen und stereoisomeren Lokalanästhetika

Verschiedene Untersuchungen über die Zusammenhänge zwischen Wirkung und Verteilungsverhalten homologer Lokalanästhetika haben ein symbates Verhalten zwischen beiden Eigenschaften ergeben (30-32). Diese Zusammenhänge lassen sich mit anstehenden hydrophoben Bindungskräften der Homologen erklären, die sowohl für die Wirkungszunahme mit Vergrößerung der Kettenlänge (verstärkte Arzneistoff-Rezeptor-Wechselbeziehung) als auch für die verstärkte Lösung in der organischen Phase verantwortlich gemacht werden.

Auch bei anderen Arzneistoffklassen wurden solche Beziehungen beobachtet (Sulfonamide, Antibiotica, Cardenolide u.a. (59)). SCHOLTAN (59) fand eine ausgeprägte Zunahme der Bindung an makromolekulare Stoffe (Eiweiß, RNS), wenn der lipophile Charakter eines Pharmakons durch Einführung hydrophober Substituenten (z.B. Alkylgruppen oder aromatische Gruppen) verstärkt wurde. Die Substitution von Wasserstoff durch Methylgruppen führt z.B. bei Sulfapyrimidinen in dem Maße zu einer Änderung der freien Reaktionsenergie (ΔF^0), wie sich die Zahl der CH_3 -Gruppen vergrößert. Sie nimmt pro eingeführter CH_3 -Gruppe um etwa 850 cal/Mol zu. Hieraus resultiert eine erhöhte Bindungsaffinität (Bindungskonstante K). Aus der Verstärkung der Eiweißbindung durch die Alkylreste folgert SCHOLTAN, daß sich diese an hydrophobe Seitenketten des Albumins anlagern.

Die Einführung von Alkylgruppen ist von einer entsprechenden Zunahme des Verteilungskoeffizienten begleitet. Diese steht in direkter Beziehung zur Größe der Eiweißbindung eines Pharmakons und charakterisiert somit das Ausmaß des hydrophoben Bindungsanteils (59).

Im Rahmen unserer Fragestellung wurden die Zusammenhänge zwischen Lipidlöslichkeit und Wirkung bei homologen Cinchocainen untersucht. Diese Versuche wurden vorgenommen, da die biologische Prüfung homologer Lokalanästhetika-Reihen bisher an Testobjekten erfolgte, die wie oben ausgeführt, nur wenig für eine exakte Erforschung der Struktur-Wirkungsbeziehung geeignet sind. Es war daher eine Überprüfung der bisher bekannten Ergebnisse notwendig, die wir am Beispiel der homologen Cinchocaine durchführten. Diese Untersuchungen sind gleichzeitig eine Voraussetzung für die geplanten Studien über die Zusammenhänge zwischen physikalisch-chemischen Eigenschaften und biologischer Wirkung bei diastereomeren Lokalanästhetika, die zu einem Nachweis asymmetrischer Membranstrukturen dienen.

1. Prüfung homologer Cinchocaine

Die Zusammenhänge zwischen den physikalisch-chemischen Eigenschaften und der lokalanästhetischen Wirkung homologer Reihen wurden von BÜCHI und Mitarbeitern (31) am Beispiel der Cinchocaine einer eingehenden Untersuchung unterzogen. Solche Studien wurden von BÜCHI (60) auch auf weitere homologe Reihen ausgedehnt (z. B. Procaine, Anaesthesine, Tetracaine u. a.).

In der Klasse der Cinchocaine fand MIESCHER (61) an der Kaninchencornea mit steigender Kettenlänge des Alkoxy-Restes eine Zunahme der oberflächenanästhetischen Wirkung bis zum Butoxy-Derivat und anschließend einen Wirkungsabfall. Der Wirkungsanstieg der Homologen war von einer Zunahme der Lipoidlöslichkeit und des Eiweißbindungsvermögens sowie von einer Abnahme der Wasserlöslichkeit begleitet (Abb. 17).

In eigenen Untersuchungen wurde die Beeinflussung der Reizfortleitung durch homologe Cinchocaine am Ventrikelstreifen des Frosches bei pH 6,4 geprüft. Bei diesem pH liegen die Cinchocaine zu mehr als 99 % als Kationen vor ($pK_a = 8,83$). Die Homologen C_1 bis C_6 (Tab. 4) setzen die LG auf eine prinzipiell ähnliche Weise herab. Der Verlauf der LG-Abnahme unter der Wirkung der Cinchocain-Homologen ist in Tab. 3 wiedergegeben.

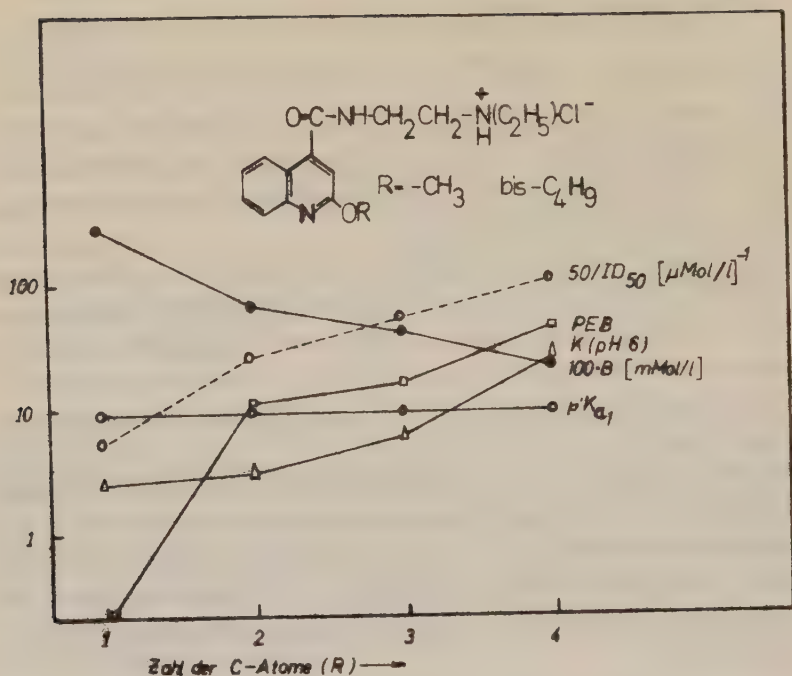


Abb. 17: Zusammenhänge zwischen den physikalisch-chemischen Eigenschaften (Werte nach BÜCHI (31, 63)) und der erregungshemmenden Wirkung am Froschventrikel bei Cinchocain-Homologen

- — □ Prozentzahl des Eiweißbindungsvermögens (PEB)
- Δ — Δ Verteilungskoeffizient K (pH 6, 0)
- — ● Basenlöslichkeit [B] · 100 [mMol/l]
- — ○ Dissoziationskonstante p'K_{a1}
- — ○ — ○ Hemmstoff-Konzentration 50/ID₅₀ [μMol/l]⁻¹, pH 6, 4

Abzisse: Zahl der C-Atome der Alkoxykette

Ordinate: numerische Größe der untersuchten physikalisch-chemischen Eigenschaften und der biologischen Wirkung

Tabelle 3: Prozentuale Hemmung der Erregungsleitungsgeschwindigkeit LG (cm/sec) unter der Einwirkung von Cinchocain-Homologen bei pH 6,4. Als Streuungswerte sind die mittleren Fehler ($\bar{x}$) der Mittelwerte ($\bar{x}$) angegeben ($n = 8-10$).

Verbindung R=	Einw.-Zeit (Min.)	Testkonzentration [$\mu\text{Mol/l}$]		
		3,0	4,5	6,0
-CH ₃	6	4,5 $\pm$ 1,1	9,1 $\pm$ 1,3	10,3 $\pm$ 1,8
	12	9,9 $\pm$ 1,6	16,5 $\pm$ 1,7	19,3 $\pm$ 2,6
	18	12,8 $\pm$ 1,6	19,3 $\pm$ 1,9	26,0 $\pm$ 3,1
	24	13,6 $\pm$ 1,5	22,1 $\pm$ 2,7	30,5 $\pm$ 4,2
	30	14,1 $\pm$ 1,5	24,3 $\pm$ 3,0	33,4 $\pm$ 4,9
-C ₂ H ₅	6	6,5 $\pm$ 1,9	21,2 $\pm$ 1,5	
	12	14,8 $\pm$ 1,8	33,2 $\pm$ 1,7	
	18	23,7 $\pm$ 2,0	38,2 $\pm$ 1,6	
	24	29,7 $\pm$ 1,9	41,9 $\pm$ 1,8	
	30	30,0 $\pm$ 1,9	44,8 $\pm$ 1,9	

Verbindung R=	Einw.-Zeit (Min.)	Testkonzentration [$\mu\text{Mol/l}$]	
		0,562	0,810
-C ₃ H ₇	6	6,5 $\pm$ 2,5	22,0 $\pm$ 1,6
	12	16,0 $\pm$ 2,4	32,5 $\pm$ 2,0
	18	23,5 $\pm$ 3,0	38,5 $\pm$ 2,3
	24	28,0 $\pm$ 3,1	42,0 $\pm$ 3,1
	30	32,0 $\pm$ 3,5	44,5 $\pm$ 3,5

Verbindung R=	Einw.-Zeit (Min.)	Testkonzentration [$\mu\text{Mol/l}$]	
		0,252	0,375
-C ₄ H ₉	6	6,5 $\pm$ 1,9	8,0 $\pm$ 2,3
	12	15,0 $\pm$ 1,9	18,0 $\pm$ 2,5
	18	21,0 $\pm$ 2,1	27,0 $\pm$ 2,8
	24	24,5 $\pm$ 1,8	35,0 $\pm$ 3,5
	30	26,0 $\pm$ 2,5	40,0 $\pm$ 4,1

Fortsetzung von Tabelle 3:

Verbindung R=	Einw.-Zeit (Min.)	Testkonzentration [$\mu\text{Mol/l}$]		Verbindung R=	Einw.-Zeit (Min.)	Testkonzentration [$\mu\text{Mol/l}$]	
		0,375	0,740			7,5	16,0
$-\text{C}_5\text{H}_{11}$	6	3,5 $\pm$ 1,3	16,0 $\pm$ 2,8	$-\text{C}_6\text{H}_{13}$	6	3,0 $\pm$ 1,5	17,0 $\pm$ 1,9
	12	8,0 $\pm$ 1,5	24,5 $\pm$ 3,2		12	7,0 $\pm$ 1,9	26,0 $\pm$ 2,9
	18	10,5 $\pm$ 2,0	29,5 $\pm$ 3,1		18	10,0 $\pm$ 2,1	31,5 $\pm$ 3,3
	24	13,5 $\pm$ 2,1	32,5 $\pm$ 2,1		24	14,0 $\pm$ 2,3	34,5 $\pm$ 4,1
	30	14,5 $\pm$ 2,0	34,0 $\pm$ 3,3		30	14,5 $\pm$ 2,6	36,0 $\pm$ 4,2

Zur Ermittlung der ID_{50} wurden drei verschiedene Konzentrationen des C_1 -Homologen geprüft. Die prozentuale Änderung der LG ist am Beispiel dieser Verbindung in Abb. 18, die zugehörige Dosis-Wirkungsbeziehung in Abb. 19 dargestellt. Die ID_{50} -Werte für die folgenden Homologen wurden analog ermittelt. Sie sind in Tab. 4 aufgeführt.

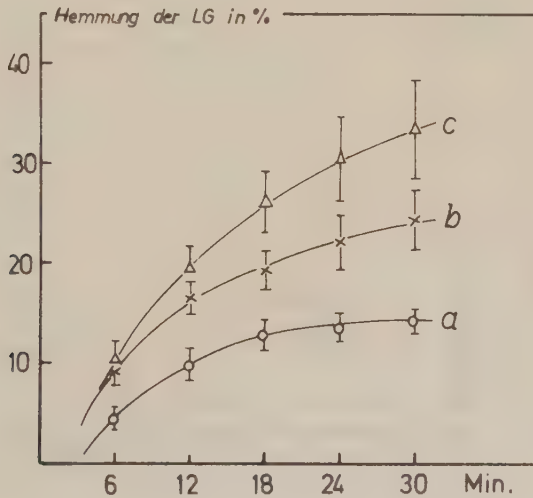


Abb. 18: Zeit-Wirkungskurve; prozentuale Änderung der Leitungsgeschwindigkeit LG unter der Wirkung von 2-Methoxy-chinolin-4-carbonsäure-diäthyläthylendiamid-hydrochlorid in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit.

a: 3,0 $\mu\text{Mol/l}$

b: 4,5 $\mu\text{Mol/l}$

c: 6,0 $\mu\text{Mol/l}$

Abszisse: Einwirkungszeit in Minuten

Ordinate: Änderung der LG gegenüber dem Ausgangswert in %

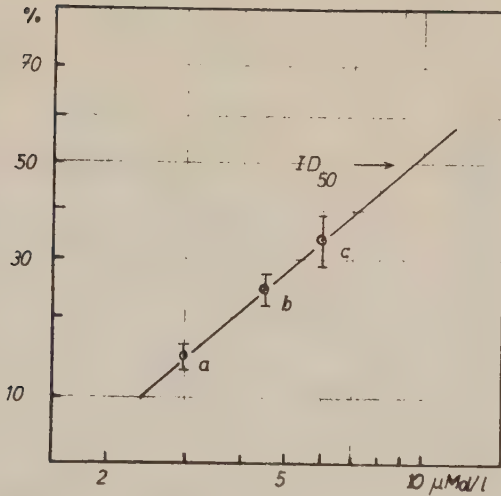


Abb. 19: Dosis-Wirkungsbeziehung: Quantitative Beziehung zwischen der Hemmstoffkonzentration und dem 30 Min. -Wirkungsprozentwert von 2-Methoxy-chinolin-4-carbonsäure-diäthyläthylendiamid-hydrochlorid bei pH 6,4 (Konzentration wie in Abb. 18)

Abszisse: Log. der molaren Konzentration

Ordinate: prozentuale Änderung der LG gegenüber dem Ausgangswert nach 30 Min. Einwirkungszeit;

Hazen-Skala im Wahrscheinlichkeitsnetz

Tab. 4: Hemmstoffkonzentrationen der Cinchocain-Homologen, die nach 30 Min. Einwirkungszeit bei pH 6,4 die Leitungsgeschwindigkeit im Ventrikelstreifen gegenüber dem Ausgangswert um 50 % herabsetzen (ID_{50})

Derivat R=	ID_{50} [$\mu\text{Mol/l}$]	$\frac{1}{ID_{50}} \cdot 10^5 \text{ Mol}^{-1}$
$-\text{CH}_3$	9,50	1,05
$-\text{C}_2\text{H}_5$	1,95	5,13
$-\text{C}_3\text{H}_7$	0,90	11,11
$-\text{C}_4\text{H}_9$	0,50	20,00
$-\text{C}_5\text{H}_{11}$	1,10	9,10
$-\text{C}_6\text{H}_{13}$	23,50	0,42
Procain (pH 7,4)	228,00	

Aus Tab. 4 und Abb. 20 ist ein deutlicher Wirkungsanstieg innerhalb der Homologen und ein ausgeprägtes Wirkungsmaximum beim Butoxy-Derivat zu entnehmen. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von MIESCHER (61). Den anschließenden Wirkungsabfall bei den folgenden C_5 - und C_6 -Homologen konnten wir gleichfalls feststellen.

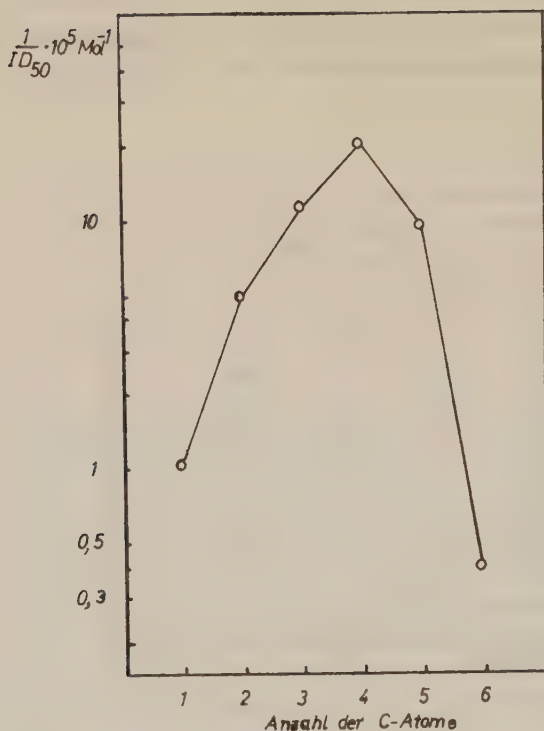


Abb. 20: Reziproke ID_{50} der Cinchocain-Homologen in Abhängigkeit von der Anzahl der C-Atome. Wirkungsmaximum beim Butoxy-Derivat. Der Abfall erklärt sich aus der zunehmenden sterischen Hinderung.

Diese Ergebnisse deuten wir wie folgt:

1. Die Basenstärke der tertiären Aminogruppe, ihre räumliche Struktur und die Ladungsverteilung sind bei den einzelnen Homologen nahezu gleich. Sie unterscheiden sich lediglich durch die unterschiedliche Länge der Alkoxy-Reste. Deshalb muß angenommen werden, daß die Cinchocaine eine gleichstarke Ionenbindung mit einer anionischen Stelle am Wirkungsort eingehen. Der beobachtete Wirkungsanstieg kann nur auf die Alkoxygruppe zurückgeführt werden, mit deren Verlängerung die hydrophobe Wechselbeziehung zu lipophilen Seitenketten in den Strukturproteinen offenbar ver-

stärkt wird. Neben den elektrostatischen Kräften muß der hydrophoben Bindung demnach eine wesentliche Rolle zugeschrieben werden.

2. Den Wirkungsabfall der höheren Homologen erklären wir mit einer Abnahme der Bindungskräfte infolge einer sterischen Behinderung. Die Abnahme der Wirksamkeit vom C₄- zum C₅- und C₆-Homologen führen BÜCHI u. PERLIA (62) dagegen auf eine zu geringe Wasserlöslichkeit zurück. Sie erklären dieses Phänomen folgendermaßen:

Bei den höheren Homologen kommt es im biologischen Versuch durch Annäherung des pH der 2,5 mmolaren Wirkstoff-Lösungen an den physiologischen Wert 7,3 zu einem Ausfall der freien Base (Cut-off-Effekt) und damit zu einer Verringerung der Wirkstoffkonzentration (protonisierte Cinchocain-Base) am Wirkort.

Für den Amyloxy- und Hexyloxy-Homologen ergeben sich bei pH 6,4, bei dem wir unsere Testungen durchführten, Gesamtlöslichkeiten ($BH^{\oplus} + B$) von 14,3 mMol/l bzw. 1,81 mMol/l (31). Wie aus Tab. 4 ersichtlich, liegen die von uns ermittelten ID₅₀-Werte vier bzw. zwei Zehnerpotenzen unter den Werten der maximalen Gesamtlöslichkeit. Als Ursache für den Wirkungsabfall schließen wir daher eine zu geringe Wasserlöslichkeit aus.

BÜCHI (63) hat bei Eiweißbindungsversuchen signifikante Beziehungen zwischen dem Grad der Albumin-Bindung und der lokalanästhetischen Wirkung festgestellt. Dabei wurden Werte erhalten, die uns die Bestimmung der Bindungskonstanten (k^* , K und K_1) sowie der freien Reaktionsenergie (ΔF^0) ermöglichen. Wir haben die Bindungskonstanten nach einem bei SCHOLTAN (59) angegebenen Verfahren graphisch und rechnerisch ermittelt. Hierzu wurden die bei BÜCHI (63) aufgeführten Werte c_f für die freie und c_g für die gebundene Lokalanästhetikumkonzentration benutzt.

Trägt man in die Abszisse eines Koordinatensystems den Logarithmus der Konzentration c_f (mg%) an freiem Arzneistoff und als Ordinate den Logarithmus der Konzentration c_g (mg%) an gebundenem Arzneistoff, so ergibt sich k^* als Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate bei $c_f = 1$. Die Gleichgewichtskonstante k^* kennzeichnet das Bindungsvermögen des makromolekularen Stoffes (Protein) und die Affinität der Reaktion. Sie gibt das Verhältnis der Konzentration gebundenes zu freiem Pharmakon an. Bei Auftragung des Quotienten c_g/c_f (Ordinate) gegen c_g (Abszisse) erhält man die dimensionslose Konstante K , durch Extrapolation der Bindungsgerade auf $c_g = 0$. Sie ist eine der Gesamtbindungskonstante K_1 proportionale Größe. Die Gesamtbindungskonstante (Bruttokonstante) K_1 wird nach der Gleichung ermittelt:

$$K_1 = \frac{K}{\text{molare Konz. Albumin}}$$

Aus der Gesamtbindungskonstante K_1 wurde die freie Reaktionsenergie ΔF^0 der Bindung nach folgender Beziehung berechnet:

$$\Delta F^0 = -RT \ln K_1$$

R = allgem. Gaskonstante

T = absol. Temperatur ($^{\circ}K$)

Die Ergebnisse dieser Berechnungen haben wir zusammen mit dem Verteilungsverhalten der Homologen in Tab. 5 aufgeführt. Hieraus geht hervor, daß mit Verlängerung der Alkoxykette eine Zunahme der freien Reaktionsenergie ΔF^0 verbunden ist. Da die elektrostatischen Bindungskräfte, wie bereits erwähnt, für alle Homologen gleich groß sind, muß der Anstieg der freien Reaktionsenergie ΔF^0 auf das $-CH_2-$ -Inkrement zurückgeführt werden. Als Durchschnittswert der freien Reaktionsenergie können ca. 650 cal/Mol pro $-CH_2-$ -Gruppe angenommen werden.

Zusammenfassend läßt sich aus den erhobenen Befunden somit folgende Gesetzmäßigkeit ableiten:

Mit Verlängerung der Alkoxykette um jeweils eine $-CH_2-$ -Gruppe ist

- eine Zunahme der negativen freien Reaktionsenergie (ΔF^0),
- ein Anstieg der Lipoidlöslichkeit
- eine Zunahme des Bindungsvermögens an Eiweiß (K_1) und
- ein Anstieg der leitungshemmenden Wirkung ($1/ID_{50}$)

verbunden. Diese Zusammenhänge sind bereits in den Abbildungen 17 und 20 graphisch dargestellt.

Tab. 5: Einfluß der Alkylgruppe auf die Eiweißbindung und das Verteilungsverhalten homologer Cinchocaine.

Zur Berechnung der Bindungskonstanten wurden die von BÜCHI (63) bei Dialyseversuche gegen 2%ige Rinderalbumin-Lösungen ($\text{pH} = 7,11$, $t = 37^\circ\text{C}$) ermittelten Konzentrationen c_f und c_g zugrundegelegt.

c_f = Konzentration des freien (nicht gebundenen) Wirkstoffs $[\text{mg}\%]$

c_g = Konzentration des gebundenen Wirkstoffs $[\text{mg}\%]$

Derivat	Bindungskonstanten			$-\Delta F^0$ [Kcal/Mol]	Verteilungs- koeffizient (31) pH 6,0
	k^*	K	K_L [l/Mol $\cdot 10^2$]		
$-\text{CH}_3$	-	-	-	-	2,4
$-\text{C}_2\text{H}_5$	0,24	0,12	4,25	3,71	2,8
$-\text{C}_3\text{H}_7$	0,78	0,65	22,4	4,73	5,5
$-\text{C}_4\text{H}_9$	1,75	0,96	33,1	4,96	24
$-\text{C}_5\text{H}_{11}$	3,80	3,10	106,8	5,68	82

Die Ergebnisse der biologischen Untersuchungen bestätigen das von BÜCHI und Mitarbeitern (31, 32) gefundene symbate Verhalten zwischen Lipoidlöslichkeit und lokal-anästhetischer Wirkung in homologen Reihen.

Diese Befunde gestatten die auf S. 8 erwähnten Versuche zum Nachweis asymmetrisch gebauter Membranstrukturen durch eine Studie der Zusammenhänge zwischen biologischer Wirkung und physikalisch-chemischen Eigenschaften bei diastereomeren Lokalanästhetika-Reihen.

2. Prüfung diastereomerer N-(N-Dimethylphenylalanyl)-ephedrine

Es wurde darauf hingewiesen, daß im Falle einer Wechselbeziehung diastereomerer Lokalanästhetika mit asymmetrisch gebauten Rezeptorstrukturen kein symbates Verhalten zwischen Lipoidlöslichkeit und biologischer Wirkung zu erwarten ist.

Der unterschiedliche Bau diastereomerer Verbindungen kann bei ähnlicher Lipoidlöslichkeit zu ausgeprägten Wirkungsunterschieden führen, da die verschiedene räumliche Anordnung der für die Bindung notwendigen Gruppierungen Wechselwirkungen gestattet oder erschwert. Das Fehlen eines gleichlaufenden Verhaltens von Lipoidlöslichkeit und Wirkung bei Diastereomeren ist somit als Hinweis auf asymmetrische Rezeptorstrukturen als Wirkort zu werten.

Eine Korrelation zwischen Verteilungsverhalten und Wirkung, wie dies bei homologen Lokalanästhetika-Reihen beobachtet wird, kann mit einer Wechselbeziehung zu einer nicht asymmetrischen Struktur, z. B. mit einer Einlagerung der Homologen in die Lipoidphase der Zellmembran, erklärt werden (31). Der beobachtete Wirkungsanstieg mit Zunahme der Lipoidlöslichkeit ist durch eine Verstärkung der hydrophoben Bindung an Membranproteine bedingt (s. S. 34).

Wir führten Untersuchungen dieser Art mit folgenden diastereomeren N-(Aminoacyl)-ephedrinen durch:

- | | |
|---|-------|
| 1a) N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-D-ephedrin | (LD) |
| 2a) N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-L-ephedrin | (LL) |
| 3a) N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-D-ψ-ephedrin | (LDψ) |
| 4a) N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-L-ψ-ephedrin | (LLψ) |

Der vielfach beobachtete Wirkungsunterschied zwischen der protonisierten und ungeladenen Form biologisch aktiver Amine macht eine Testung der Verbindungen 1a bis 4a bei pH-Werten erforderlich, bei denen alle Diastereomeren den gleichen Ionisationsgrad aufweisen. Für die Berechnung des Ionisationsgrades bestimmten wir die $p'K_a$ -Werte der Verbindungen 1a bis 4a durch Ermittlung des Halbneutralisationspunktes (HNP) aus den Titrationskurven. Die Konstante K_a (Aciditätskonstante) ergibt sich aus der Gleichung:

$$K_a = \frac{[H_3O^+][B]}{[BH^+]}$$

daraus folgt:

$$p'K_a = pH - \log \frac{[B]}{[BH^+]}$$

Beim Vorliegen äquivalenter Mengen an B und BH^+ entspricht der gemessene pH-Wert dem $p'K_a$ der vorgelegten Verbindung. Der Aktivitätskoeffizient wurde, wie in der Literatur üblich (64), nicht berücksichtigt, da er bei den benutzten Konzentrationen in Anbetracht der erreichten Meßgenauigkeit keine zusätzliche Verbesserung erbringt. Stattdessen wurden Konzentrationen berücksichtigt, sodaß man die klassische d. h. stöchiometrische Konstante K' erhält. Durch Zugabe der berechneten Menge KCl wurde eine konstante Ionenstärke erhalten (0, 1 μ).

Die Berechnung des Ionisationsgrades erfolgte nach der Gleichung:

$$\% B = \frac{100}{1 + 10^{p'K_a - pH}}$$

Das Verhältnis $B : BH^+$ bei pH 7,3 ist in Tab. 6 angegeben. Aufgrund der ähnlichen $p'K_a$ -Werte der Diastereomeren konnte die biologische Prüfung aller Verbindungen beim physiologischen pH 7,3 durchgeführt werden.

Das Verteilungsverhalten der Diastereomeren wurde bereits früher beschrieben (65). Als Parameter für die Lipoidlöslichkeit wurde weiterhin die Basen- und Gesamtlöslichkeit der Versuchssubstanzen in Wasser herangezogen. Die Wasserlöslichkeit der Basen bestimmten wir durch Messung des Trübungs-pH (pH_T) (66).

Unter dem Begriff Trübungs-pH versteht man jenen pH-Wert, bei welchem aus den Hydrochlorid-Lösungen der Versuchssubstanzen beim Versetzen mit Lauge die erste Ausscheidung der unlöslichen Base B auftritt. Er ist abhängig von der Löslichkeit der Verbindungen, dem $p'K_a$, der Konzentration, Temperatur und Ionenstärke (67). Durch Bestimmung der pH_T -Werte verschiedener Konzentrationen des Lokalanästhetikums errechnet man die Basenlöslichkeit nach der Gleichung:

$$[B] = \frac{s}{1 + 10^{p'K_a - pH_T}} \quad \text{mMol}$$

$[B]$ = Löslichkeit der nichtdissoziierten Base beim pH_T

pH_T = Trübungs-pH,

$s = [BH^{\oplus}] + [B]$ = Konzentration des Lokalanästhetikums beim pH_T

In Tabelle 6 sind die pH_T -Werte der diastereomeren N-(Aminoacyl)-ephedrine sowie die daraus berechneten Basenlöslichkeiten aufgeführt.

Die Gesamtlöslichkeit c besteht aus der Konzentration des dissoziierten und undissoziierten Anteils ($B + BH^{\oplus}$). Sie wurde aus den pH_T -, $p'K_a$ - und Basenlöslichkeits-Werten nach der Gleichung

$$c = [B] \left(1 + 10^{\frac{pH_T}{p'K_a}} \right) \quad [\text{mMol/l}]$$

berechnet. Die für pH 7,3 erhaltenen Werte sind in Tabelle 6 angegeben. Aus der graphischen Darstellung der Versuchsergebnisse in Abb. 21 geht hervor, daß die Gesamtwasserlöslichkeit der Wirkstoffe 1a - 4a mit steigendem pH bis zu einem Endwert, der der Wasserlöslichkeit der freien Base B in Tab. 6 entspricht, abnimmt. Die Basenstärke als auch die Löslichkeit der freien Base B bestimmen somit die höchste Konzentration der Wirkstoff-Lösung, die bei pH 7,3 hergestellt werden kann.

Der Vergleich der leitungshemmenden Wirkung diastereomerer N-(Aminoacyl)-ephedrine mit ihrem Verteilungsverhalten, Basen- und Gesamtlöslichkeit ergab kein symbates Verhalten zwischen Lipoidlöslichkeit und Wirkung, wie wir es bei homologen Cinchocainen beobachtet haben. Diese Verhältnisse sind in den Abb. 22 und 23 dargelegt. Die Anordnung der Isomeren erfolgte mit steigender Löslichkeit in Pufferlösung bei pH 7,3. Sie nimmt zu in der Reihenfolge LL, LL ψ , LD ψ , LD.

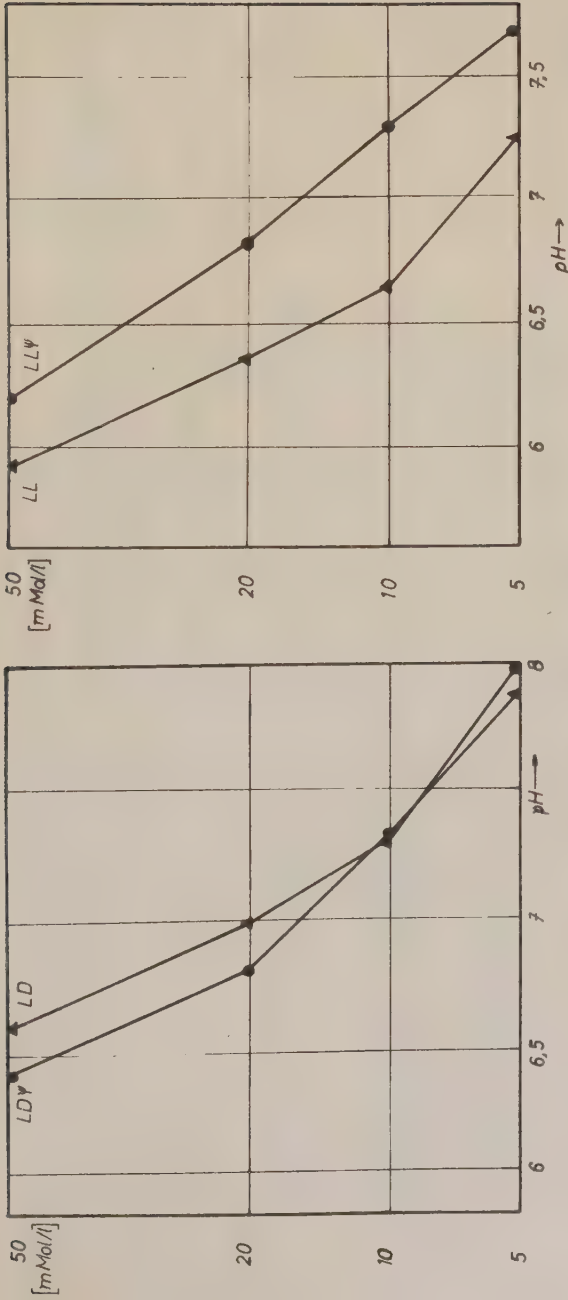


Abb. 21: Gesamtwasserlöslichkeit ($B + BH^+$) der Diastereomeren LDψ, LD und LL, LLψ in Abhängigkeit vom pH und der Konzentration bei 22°C.

Abszisse: Trübungs-pH

Ordinate: Konzentration der Ausgangslösung $[mMol/l]$

Tab. 6: Physikalisch-chemische Eigenschaften der N-(N-Dimethylphenylalanyl)-ephedrine

Verbindung	p'K _a	Ionisationsgrad [%] pH 7,3		K pH 4,5	Trübungs-pH der 50 mMol Lösung	Basenlöslich- keit (Durch- schnittswerte [mMol/l])	Gesamtwas- serlöslich- keit $c = [B] + [BH^+]$ [mMol/l], pH 7,3
		B	BH ⁺				
1 a) N-(L-N-DM-Phe)-D-ephedrin b) N-(D-N-DM-Phe)-L-ephedrin	7,54	36,6	63,4	0,87	6,5	3,81	10,43
2 a) N-(L-N-DM-Phe)-L-ephedrin b) N-(D-N-DM-Phe)-D-ephedrin	7,49	39,2	60,8	4,0	5,9	1,41	3,59
3 a) N-(L-N-DM-Phe)-D- β -ephedrin b) N-(D-N-DM-Phe)-L- β -ephedrin	7,48	39,8	60,2	2,85	6,35	3,75	9,41
4 a) N-(L-N-DM-Phe)-L- β -ephedrin b) N-(D-N-DM-Phe)-D- β -ephedrin	7,38	45,4	54,6	16,67	6,2	3,68	8,09

Abkürzungen: $K = \frac{c_0}{c_w} \frac{CHCl_3}{CHCl_3/Methanol/0,5m Citratpuffer (pH 4,5) (10:1:9)}$ bei $20 \pm 1^\circ C$ (29)

DM-Phe = Dimethylphenylalanyl -

Berücksichtigt man die an homologen Lokalanästhetika-Reihen erzielten Ergebnisse, dann wäre im vorliegenden Fall mit abnehmender Wasserlöslichkeit eine Zunahme der Wirkung zu erwarten. Der Vergleich der beiden Kurven zeigt jedoch, daß keine Zusammenhänge zwischen der leitungshemmenden Wirksamkeit und der Löslichkeit bestehen. Auch der Vergleich zwischen Basenlöslichkeit und Wirkung ergibt kein symbates Verhalten. Entsprechend unseren Erwartungen geht die durch die Konfiguration bedingte Änderung im Verteilungsverhalten ebenfalls nicht mit der Wirkung parallel. So zeigt Verbindung LL Ψ trotz ihrer großen Lipoidlöslichkeit die geringste Wirkung.

Ganz ähnlich liegen die Verhältnisse im Falle der D-Reihe. Auch hier gehen die relativ großen Unterschiede im physikalisch-chemischen Verhalten der Diastereomeren nicht mit entsprechenden Wirkungsunterschieden parallel (Abb. 23). Aus den Abb. 22 und 23 ist weiterhin ersichtlich, daß keine Korrelation zwischen Basizität und leitungshemmender Wirkung besteht. Die stereoisomeren Verbindungen unterscheiden sich nur geringfügig in ihren Basenstärken; somit wird bei allen Isomeren eine gleich starke Ionenbeziehung zu den komplementären Stellen in der erregbaren Membran hergestellt. Die beobachteten Wirkungsunterschiede der Stereoisomeren lassen sich daher nur mit verschiedenen starken hydrophoben Wechselbeziehungen zu Membranstrukturen erklären.

Das Fehlen eines symbaten Verhaltens zwischen leitungshemmender Wirkung und Lipoidlöslichkeit ist ein Beweis dafür, daß die Wirkung der untersuchten Lokalanästhetika auf einer Anlagerung an Strukturproteine der erregbaren Membran beruht. Die unterschiedliche räumliche Anordnung der für die hydrophobe Bindung verantwortlichen Aryl- und Alkylreste bestimmt das Ausmaß der Wechselbeziehung zu den asymmetrischen Membranstrukturen und damit die Wirkungsstärke.

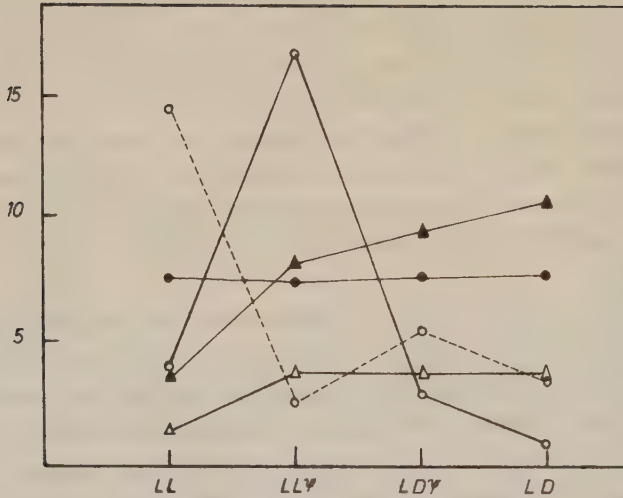


Abb. 22:

Zusammenhänge zwischen den physikalisch-chemischen Eigenschaften und der Hemmung der Erregungsleitung im Ventrikelstreifen des Froscherzens bei stereoisomeren N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-ephedrinen

○-----○ ID₅₀ Hemmstoff-Konzentration 500/ID₅₀ [μMol/l]⁻¹, die nach 30 Min. Einwirkzeit die Leitungsgeschwindigkeit im Ventrikelstreifen um 50 % herabsetzt. Test-pH 7,3

▲————▲ BH[⊕] + B Löslichkeit der Hydrochloride [mMol/l] in Pufferlösung pH 7,3

△————△ B Löslichkeit der Basen [mMol/l]

○————○ K Verteilungskoeffizient im Lösungsmittelsystem 0,5 m Citrat-Puffer (pH 4,5)-Methanol-Chloroform (9 : 1 : 10)

●————● p'K_a

Abszisse: Stereoisomere N-(Aminoacyl)-ephedrine

Ordinate: Einheiten für die physikal.-chem. Eigenschaften und biolog. Wirkung

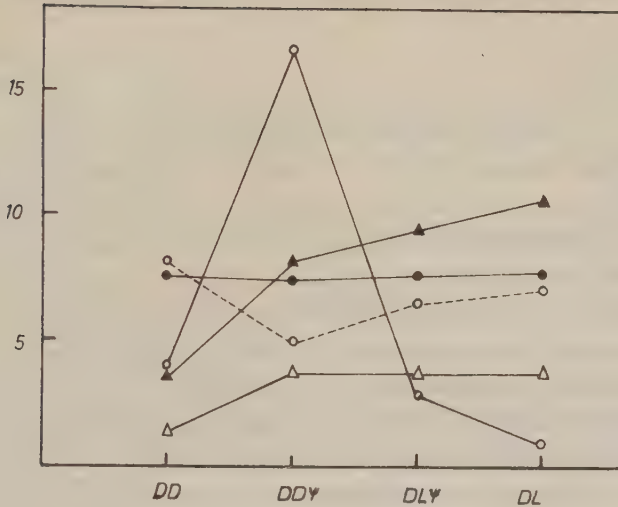


Abb. 23:

Zusammenhänge zwischen den physikalisch-chemischen Eigenschaften und der Hemmung der Erregungsleitung im Ventrikelstreifen des Froscherzens bei stereoisomeren N-(D-N-Dimethylphenylalanyl)-ephedrinen

- - - - ○ ID₅₀ Hemmstoff-Konzentration 500/ID₅₀ [μMol/l]⁻¹, die nach 30 Min. Einwirkzeit die Leitungsgeschwindigkeit im Ventrikelstreifen um 50 % herabsetzt. Test-pH 7,3
- ▲- - - - ▲ BH⁺ + B Löslichkeit der Hydrochloride [mMol/l] in Pufferlösung pH 7,3
- △- - - - △ B Löslichkeit der Basen [mMol/l]
- - - - ○ K Verteilungskoeffizient im Lösungsmittelsystem 0,5m Citrat-Puffer (pH 4,5)-Methanol-Chloroform (9 : 1 : 10)
- - - - ● p' K_a

Abszisse: Stereoisomere N-(Aminoacyl)-ephedrine

Ordinate: Einheiten für die physikal.-chem. Eigenschaften und biolog. Wirkung

C. Die Beeinflussung des elektrophysiologischen Verhaltens der Membran des Ranvierschen Schnürrings durch stereoisomere N-(N-Dimethylphenylalanyl)-ephedrine

Die Versuche mit Tetrodotoxin (TTX), Tetraäthylammoniumchlorid (TEA) und Veratridin (s. S. 18), die die Ionenleitfähigkeit der Nervenmembran verändern, lassen vermuten, daß spezifische Stellen für die Öffnung bzw. Schließung des Natrium- und Kaliumkanals existieren. Wie bereits ausgeführt (s. S. 4), wirken Lokalanästhetika bevorzugt auf den Natriumkanal. Es war in unserem Fall denkbar, daß die Konfiguration bei N-(N-Dimethylphenylalanyl)-ephedrin einen Einfluß auf die Wirkungsspezifität ausübt, d. h., daß Antipoden möglicherweise eine unterschiedliche "Kanalspezifität" aufweisen. Unsere Hoffnung war, zu einem "kanalspezifischen" und damit selektiv wirkenden Anästhetikum (wie TTX) zu gelangen.

Für diese Untersuchungen wurden von den vier Antipodenpaaren die Enantiomeren

1 a) N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-D-ephedrin (LD)

1 b) N-(D-N-Dimethylphenylalanyl)-L-ephedrin (DL)

ausgewählt. Diese Verbindungen zeigten am N. ischiadicus (29) die größten Wirkungsunterschiede.

Es war zu prüfen, ob auch am Ranvierschen Schnürring als dem eigentlichen Wirkort der Lokalanästhetika eine ähnliche unterschiedliche Wirkung der Stereoisomeren meßbar ist.

Als Versuchsanordnung diente die von MÜLLER-MOHNSEN u. BALK (68) angegebene Methode, die es gestattet im gleichen Experiment Aktionspotentiale (mit eingepreßtem Strom), sowie stationäre Kennlinien (mit eingepreßter Spannung) zu messen. Die Kontaktierung des Präparates an die elektronische Meßanordnung, d. h. die Zuführung und Ableitung der Meßströme und -spannungen erfolgte in der 3-Elektrodenanordnung mit Luftspaltisolierung nach STÄMPFLI (100).

Diese Technik eignet sich für die Untersuchung von Wirkungsunterschieden enantiomerer Lokalanästhetika aus folgenden Gründen:

1. der Schnürring wird unmittelbar von der Testlösung umspült, dadurch werden die Diffusionsstrecken und -barrieren und
2. der dadurch bedingte Meßfehler elektrischer Größen durch Verminderung des elektrischen Kurzschlusses stark reduziert, zudem ermöglicht

3. der von STÄMPFLI entwickelte Dreilwegehahn ein sehr schnelles (in weniger als 1 Sec.) und vollständiges Wechseln der Testlösung.

Für die Untersuchung von Lokalanästhetika sind u. a. folgende Prüfparameter bedeutend:

1. die Amplitude und Anstiegssteilheit des Aktionspotentials.

Ihre Veränderung wird mit einer Wirkung auf das " $\text{Na}^{\oplus}$ -System" erklärt (12).

2. der zeitliche Verlauf.

Die Messung dieser Größe ermöglicht die Wirkungskinetik einer Substanz zu verfolgen.

Ferner gestattet die Methode die Wirkung der Enantiomeren auch auf das stationäre Verhalten der Membran zu kontrollieren, d. h.

1. auf das Membranpotential und
2. auf das stationäre Strom-Spannungsverhalten, indem Strom-Spannungskurven aufgenommen werden, welche Membranströme in Abhängigkeit von der Membranspannung geben.

Es wurde festgestellt, daß an sechs von neun verschiedenen Schnürringen die Verbindung DL (Ib) eine stärkere Abnahme der Anstiegssteilheit des Aktionspotentials bewirkte (Abb. 24a). Allerdings wechselte an ein und demselben Schnürring in einer Reihe von Fällen bei gleicher Dosierung die Wirksamkeit der Antipoden (Abb. 24b), sodaß mit diesen Versuchen nicht entschieden werden kann, welcher der beiden Isomeren die größere Wirkung auf die Anstiegssteilheit des Aktionspotentials aufweist.

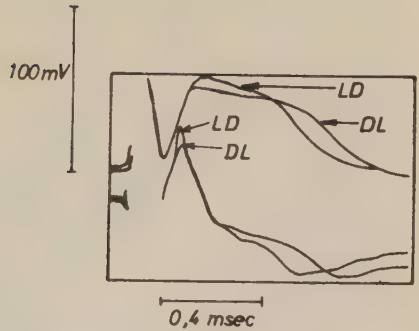
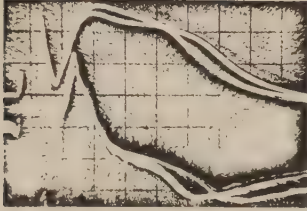
Der Schnürring stellt elektrophysiologisch gesehen eine kleine erregbare Einheit der gesamten Membran der Nervenfaser dar. Dagegen kann man den Ventrikelstreifen des Froschherzens als ein Faserkontinuum aus einer Vielzahl solcher erregbarer Elemente bestehend betrachten. Die Leitungsgeschwindigkeit im Ventrikelstreifen steht in direkter Beziehung zur Anstiegszeit (Steilheit) der Aktionspotentiale der vielen erregbaren Einheiten entlang des Faserkontinuums (69). Deshalb sind im Gegensatz zum Ranvierschen Schnürring am Ventrikelstreifen durch Mittelung der Wirkung an den genannten elektrophysiologisch erregbaren Einheiten signifikante Wirkungsunterschiede der Stereoisomeren zu erkennen.

Verbindung DL (Ib) zeigt im Gegensatz zu LD (Ia) in einigen Fällen eine verzögernde Wirkung auf die 1. Repolarisationsphase des Aktionspotentials (Abb. 24 a). Sie stellt einen Nebeneffekt der lokalanästhetischen Wirkung dar und ist als eine Veränderung der Ionenleitfähigkeit während der Repolarisation zu deuten. Die während einer $K^{\oplus}$ -Depolarisation gemessenen stationären Kennlinien werden durch die Isomeren jedoch nicht merklich verändert.

Kennlinien mit negativ stationärem Widerstand lassen sich auch während einer Veratridin-Vergiftung messen. Dieses Alkaloid erhöht die stationäre $Na^{\oplus}$ -Leitfähigkeit und bewirkt dadurch eine Depolarisation der Membran. Beide Enantiomere (Konz.: $30 \cdot 10^{-5}$ Mol/l) führen das Membranpotential auf den Wert des Ruhepotentials zurück und es läßt sich trotz anhaltender Wirkung von Veratridin wieder eine stationäre Gleichrichtercharakteristik an der Ruhemembran messen, die der normalen Ruhekennlinie gleicht. Die Enantiomeren wirken demnach Veratridin-antagonistisch, indem sie die stationäre Erhöhung der $Na^{\oplus}$ -Leitfähigkeit während der Veratridin-Vergiftung rückgängig machen (Abb. 25 b).

Diese Befunde lassen den Schluß zu, daß die Isomeren unabhängig von der Konfiguration allein auf die stationäre $Na^{\oplus}$ -Leitfähigkeit wirken.

a:



b:

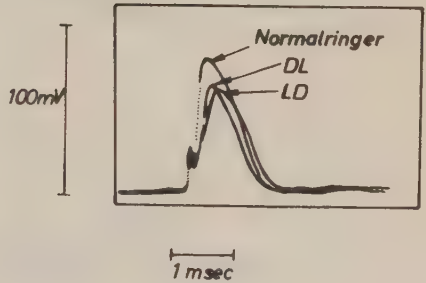
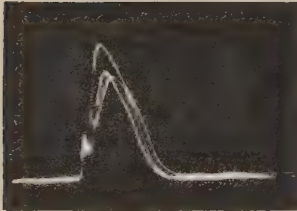


Abb. 24: Aktionspotential eines isolierten, gespülten Ranvierschen Schnürrings unter Wirkung von

N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-D-ephedrin (LD) und

N-(D-N-Dimethylphenylalanyl)-L-ephedrin (DL) ($15 \cdot 10^{-5}$ Mol/l)

Die unteren Kurven in Abb. 24a zeigen die Registrierung des differenzierten Aktionspotentials, durch welche die "Steilheiten" (dv/dt) des AP gemessen werden.

a) Substanz DL vermindert die Anstiegsgeschwindigkeit des Aktionspotentials stärker als LD

b) Hier zeigt im Gegensatz zu Abb. 24a LD die stärkere Wirkung

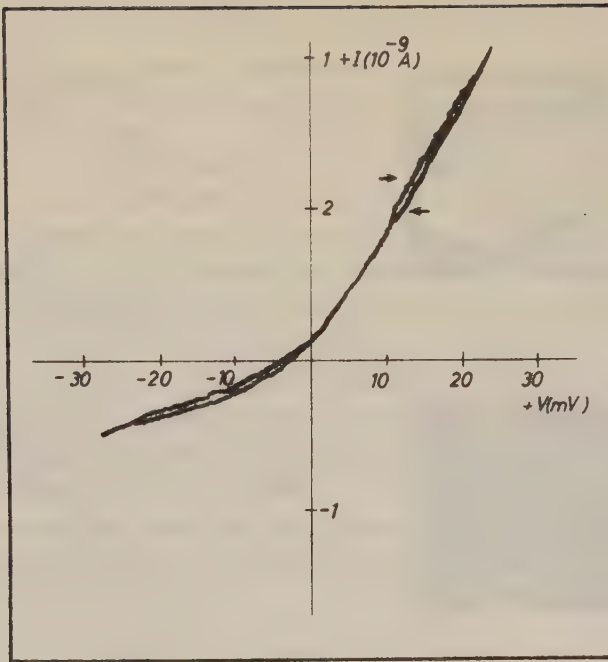


Abb. 25 a: Stationäre Strom-Spannungs-Charakteristik des Ranvierschen Schnürrings unter voltage-clamp-Bedingungen nach MÜLLER-MOHNSEN (82) in Normal-Ringerlösung

Abszisse: stationär eingepreßte Spannung, Depolarisation positiv, Polarisation negativ

Ordinate: Membranstrom, Auswärtsstrom positiv, Einwärtsstrom negativ

Pfelle geben die Abtastrichtung an.

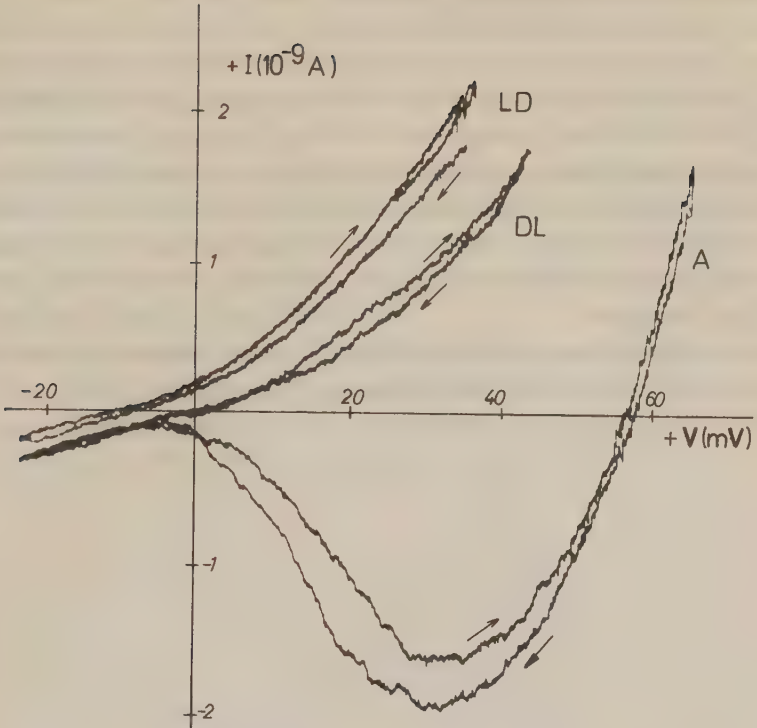


Abb. 25 b: A: Veränderung der stationären Kennlinie unter Einwirkung von Veratridin ($14 \cdot 10^{-6} \text{ Mol/l}$), Original-Registrierung

DL: weitgehende Aufhebung der Veratridin-Wirkung nach N-(D-N-Dimethylphenylalanyl)-L-ephedrin ($30 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$)

LD: weitgehende Aufhebung der Veratridin-Wirkung nach N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-D-ephedrin ($30 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$)

Abszisse u. Ordinate wie in Abb. 25 a.

Zusammenfassung zu den Kapiteln B und C:

Die unterschiedliche Wirkung der enantiomeren N-(N-Dimethylphenylalanyl)-ephedrine sowie N-(Aminoacyl)-2, 6-dimethylaniline und das Fehlen eines symbaten Verhaltens von Lipoidlöslichkeit und leitungshemmender Wirkung bei diastereomeren N-(N-Dimethylphenylalanyl)-ephedrinen bestätigen unsere Annahme, daß Lokalanästhetika mit Strukturproteinen der erregbaren Membranen in Wechselbeziehung treten und auf diese Weise ihre anästhetische Wirkung entfalten. Die Ergebnisse zeigen darüberhinaus, daß Wirkungsunterschiede Enantiomerer kein ausreichendes Kriterium für eine spezifische Wirkung sind.

Sie widersprechen damit der PFEIFFER-Regel ⁺⁾ , die eine enge Beziehung zwischen wirksamer Dosis und dem Wirkungsverhältnis von Enantiomeren aufstellt.

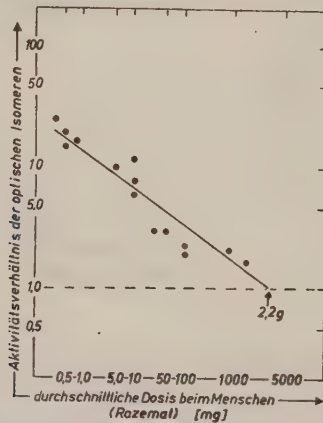


Abb. 26: Zusammenhang zwischen wirksamer Dosis von Racematen und Aktivitätsverhältnis der Enantiomeren. Doppelt logarithmische Darstellung. Nach BECKETT (46).

Hoch strukturspezifische Pharmaka zeichnen sich nach dieser Regel durch niedrige Dosen und hohes Wirkungsverhältnis ihrer Antipoden, wenig spezifische Verbindungen dagegen durch hohe Dosen und geringe Wirkungsunterschiede der Enantiomeren aus.

⁺⁾ Siehe dazu: E. J. ARIENS (70)

Die erheblichen Wirkungsunterschiede enantiomerer Lokalanästhetika, wie sie bei Messungen am Ventrikelstreifen des Froschherzens besonders bei pH 8,3 (Abb. 32) auftreten, würden nach der PFEIFFER-Regel für eine spezifische Wirkung der Lokalanästhetika sprechen. Im Gegensatz dazu steht ihre bekannte außerordentlich geringe Strukturspezifität.

Das wichtigste Kriterium für eine spezifische Wirkung ist daher der Wirkungsverlust bei struktureller Abwandlung. Die Reaktion des Pharmakons mit einem spezifischen Rezeptorareal erfordert entsprechend der Schlüssel-Schloß-Theorie einen rezeptorkomplementären Bau, der sich aus der Struktur und aus der räumlichen Anordnung der verknüpfenden Gruppierungen ergibt.

Die sogenannten unspezifisch wirkenden Stoffe, von denen eine Wechselbeziehung mit Membranproteinen anzunehmen ist, können entgegen der PFEIFFER-Regel erhebliche Wirkungsunterschiede ihrer Stereoisomeren aufweisen; sie zeigen aber immer eine geringe Abhängigkeit ihrer Wirkung von der Struktur.

D. Die Bedeutung der verschiedenen Molekülgruppen von Lokalanästhetika für die Wechselbeziehung mit Strukturproteinen

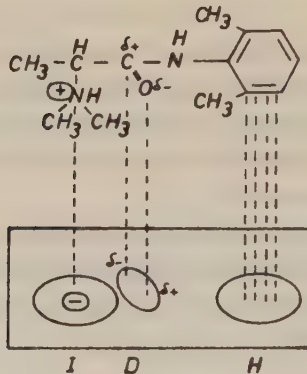


Abb. 27: Modell einer Wirkstoff-Rezeptor-Bindung am Beispiel von N-(N-Dimethylalanyl)-2,6-dimethylanilin

I = Ionenbindung D = Dipol-Dipol-Bindung
H = Hydrophobe Wechselwirkung

Für die Verknüpfung von Lokalanästhetika mit Strukturproteinen der Membran sind folgende Bindungsarten zu diskutieren:

Ionenbindung

- Bindung zwischen der protonisierten Aminogruppe des Lokalanästhetikum-Moleküls und einer anionischen Gruppierung am Strukturprotein ($-\text{COO}^-$)-

Diese Bindungsart ist für die überwiegende Zahl der gebräuchlichen Lokalanästhetika von fundamentaler Bedeutung. Das zeigen Untersuchungen zur Frage, ob die protonisierte Form des Lokalanästhetikum-Moleküls oder die freie Lokalanästhetikum-Base als die eigentliche Wirkform anzusehen ist. In einer ausführlichen Diskussion dieses Problems kommen RITCHIE und GREENGARD (21) zu der Auffassung, daß Lokalanästhetika-Moleküle als Kationen an die Rezeptoren der Nervenzellmembran gebunden werden.

Die Energie der elektrostatischen Wechselbeziehung ist dem Quadrat des Abstandes zwischen den Ladungszentren umgekehrt proportional. Sterische Faktoren können

daher die Stärke der Ionenbeziehung erheblich beeinflussen.

Im Falle der Dimethylammonium-Gruppe, die in den von uns untersuchten Lokalanästhetika enthalten ist, muß man ebenfalls mit einer schwachen sterischen Behinderung rechnen.

Nach Untersuchungen von WILSON (99) wurde aber eine verstärkte Bindung der Dimethylammonium-Gruppe (+2,4 Kcal/Mol) an anionische Bindungsstellen beobachtet. Diese Zunahme der Bindungsenergie kann mit hydrophoben Wechselbeziehungen der Methylgruppen zum Strukturprotein erklärt werden.

Dipol-Dipol-Bindung und Wasserstoff-Brücken-Bindung

- Wechselbeziehung zwischen der CO-Gruppe des Lokalanästhetikums und einer Dipol- bzw. Ionen-Gruppe oder einem beweglichen Wasserstoff des Strukturproteins -

Die Zusammenhänge zwischen der Reaktivität (Dipol-Eigenschaft) der CO-Gruppe und der lokalanästhetischen Wirkung haben BÜCHI und Mitarb. (71) eingehend bei homologen Cinchocainen durch Bestimmung der Verseifungsgeschwindigkeit, pK_a -Messungen an den zugehörigen freien Carbonsäuren und durch IR-Studien untersucht. Sie konnten kein symbates Verhalten zwischen diesen Eigenschaften und der biologischen Wirkung feststellen.

Die Energie der Dipol-Dipol-Wechselbeziehung ist gering und stark vom Abstand der Dipole und deren gegenseitigen Orientierung abhängig.

Die H-Brückenbindung liefert ebenfalls nur einen sehr kleinen Energiebeitrag: Die Änderung der freien Energie beim Austausch einer H-Brückenbindung mit einem H_2O -Molekül gegen eine solche mit einem Strukturprotein ist gering.

Bei der Wechselbeziehung zwischen Lokalanästhetikum-Molekül und Strukturprotein ist der Dipol-Dipol-Bindung und der H-Brückenbindung nur eine untergeordnete Bedeutung zuzuschreiben.

Hydrophobe Bindung

Hydrophobe Bindungen entstehen durch die Fähigkeit unpolarer Molekülgruppierungen in wässriger Lösung zu assoziieren. Ihre Bildung ist endotherm; der Vorgang wird jedoch durch eine starke Zunahme der Entropie ermöglicht. In der Nachbar-

schaft unpolarer Gruppen sind die Wassermoleküle stärker geordnet; sie bilden durch H-Brückenbeziehung eisartige Strukturen ("clusters"). Die hydrophobe Wechselwirkung unpolarer Gruppen führt zu einer Abnahme dieser Ordnung (Zerfall der clusters zu einzelnen H_2O -Molekülen) und damit zu einer Zunahme der Entropie und zu einer negativen freien Bindungsenergie (72, 73). Für die Wechselbeziehung der Kohlenwasserstoffreste sind van der Waal'sche Kräfte verantwortlich. Diese nehmen mit der 6. Potenz des Abstands zwischen den reagierenden Gruppen ab und werden von der Ladungsverteilung und Polarisierbarkeit der Moleküle stark beeinflusst. Eine aus sterischen Gründen erschwerte Näherung dieser Kohlenwasserstoffreste führt daher auch zu einer Verhinderung oder Abschwächung der hydrophoben Wechselwirkung.

Hydrophobe Beziehungen zwischen apolaren Gruppierungen in Proteinen sind bei der Bildung stabiler Konformationen wesentlich beteiligt. Bei Proteinen geringer konformativer Stabilität⁺⁾ kann es bei Zugabe niedermolekularer Verbindungen mit hydrophoben Gruppierungen zu einer Wechselwirkung mit entsprechenden unpolaren Gruppen des Makromoleküls und so zu einer Änderung der Konformation (Aufbrechen der hydrophoben Bereiche des Proteins) kommen. Die Wirkung von Inhibitoren auf Enzyme lassen sich durch solche Vorgänge erklären. Andererseits kann die hydrophobe Bindung kleiner Moleküle aber auch zu einer Stabilisierung der Protein-Konformation führen, wie Untersuchungen von LOVRIEN (74), und von MARKUS und Mitarbeitern (75) gezeigt haben.

Eine Stabilisierung makromolekularer Strukturen (z. B. Proteine), wie wir sie als Wirkungsweise der Lokalanästhetika annehmen, wurde auch bei Detergentien beobachtet. So verhindert Natriumdodecylsulfat die Denaturierung von Rinder-Serumalbumin (72, 74, 75). Eine Voraussetzung für diesen stabilisierenden Effekt ist neben einer hydrophoben Wechselwirkung die Bindung der anionischen Gruppe des Detergens an eine kationische Gruppe der Proteinoberfläche (75).

Im Gegensatz zu dieser Beobachtung führen Kohlenwasserstoffe zu einer Auffaltung (Denaturierung) von Rinder-Serumalbumin und β -Lactoglobulin (83) ⁺⁺⁾.

⁺⁾ Die Nervenzellmembran enthält wahrscheinlich Proteine von geringer konformativer Stabilität, die für die Permeationsänderungen verantwortlich sind.

⁺⁺⁾ Die Wirkung des Veratridins, das zu einer Veränderung der Membranstruktur führt, wird möglicherweise durch einen solchen Vorgang hervorgerufen.

Lokalanästhetika und Detergentien⁴⁾ wirken anscheinend aufgrund ihrer bifunktionellen Molekülstruktur. Sie verhindern die hydrophobe Wechselwirkung unpolarer Reste des Proteins und damit Konformationsänderungen, welche in der Nervenmembran die Ursache für eine Permeationsänderung sein könnten.

Bei der Wechselbeziehung der Lokalanästhetika mit Strukturproteinen ist neben der Ionenbindung den hydrophoben Bindungskräften die wohl größte Bedeutung zuzuschreiben. Der Anteil solcher hydrophober Kräfte bei der Bindung von Wirkstoffmolekülen an Rezeptoren kann erheblich sein, wie ANDERSON (76) am Beispiel der Hemmung von Alkohol-Dehydrogenase zeigte. Er beträgt für den Inhibitor N-Dodecylpyridinium 66% der gesamten freien Bindungsenergie.

Einen deutlichen Hinweis für die Bedeutung der hydrophoben Bindungskräfte bei der Lokalanästhetika-Wirkung geben die umfassenden Untersuchungen von BUCHI und Mitarbeitern (31, 63, 71) an homologen Cinchocainen. Diese Verbindungen unterscheiden sich strukturell nur durch die unterschiedliche Länge des Alkoxyrestes. Die Basizität und Ladungsverteilung der Homologen sind annähernd gleich. Die beobachteten Wirkungsunterschiede lassen sich somit nur durch verschieden starke hydrophobe Wechselbeziehungen zwischen Wirkstoff und Strukturprotein erklären (s.S. 35).

Wirkungsstudien mit Lokalanästhetika bei verschiedenen pH-Werten

Die Bedeutung der Ionenbindung bei der Wechselbeziehung zwischen Lokalanästhetika und Membranproteinen kann aus der Abhängigkeit der leitungshemmenden Wirkung von der H^+ -Konzentration abgeschätzt werden. Die für die Verknüpfung in Betracht kommenden COOH-Gruppen (α -Carboxylgruppe pK_a 3,25; Carboxylgruppe pK_a 4,0) des Strukturproteins sind im Testbereich (pH 6,2 - 8,3) praktisch zu 100% ionisiert; das Lokalanästhetikum-Kation findet in dem gewählten pH-Bereich für eine Ionenbeziehung daher stets gleichartige Bedingungen. Die von uns benutzten, schwach basischen Lokalanästhetika werden dagegen in dem untersuchten Bereich mit abnehmender H^+ -Konzentration in zunehmenden Maß entladen. Ein Abfall der leitungshemmenden Wirkung mit steigendem pH müßte, da sich die Nettoladung des Strukturproteins in diesem Bereich nur geringfügig ändert, mit einer sinkenden elektrostatischen

⁴⁾ Detergentien vom Typ der Polyglykoläther und Polyglykolester finden als Lokalanästhetika Verwendung (1).

Wechselbeziehung Lokalanästhetikum-Strukturprotein als Folge der zunehmenden Entladung der Wirkstoffmoleküle gedeutet werden.

Umgekehrt besagt aber eine Zunahme der Wirksamkeit mit steigender $H^{\oplus}$ -Konzentration nicht, daß das Lokalanästhetikum-Kation ausschließlich durch elektrostatische Kräfte gebunden wird. Durch die positive Aufladung des Stickstoffatoms wird auch die Ladungsverteilung und die Polarisierbarkeit des Gesamtmoleküls verändert. Diese beeinflussen ihrerseits das Ausmaß der van der Waal'schen Wechselwirkung Lokalanästhetikum-Strukturprotein.

Für die Prüfung der biologischen Wirkung unter Verwendung verschiedener $H^{\oplus}$ -Konzentrationen ist der Ventrikelstreifen des Frosches besonders geeignet. Er enthält im Unterschied zu anderen Versuchsanordnungen (z. B. N. ischiadicus des Frosches) keine Diffusionsbarrieren (Epi-, Peri- und Endoneurium). Diese führen bei verschiedenen pH-Werten der Testlösung zu unterschiedlichen Pharmakonkonzentrationen am Wirkort und zu verschiedenen $H^{\oplus}$ -Konzentrationen in der Biophase und im Organbad.

Wie bereits erwähnt, sind die Herzmuskelfasern protoplasmatisch miteinander verbunden, d. h. sie bilden ein Syncytium. Eine Vorstellung vom elektrischen Bauplan des Syncytium ist in Abb. 28 dargestellt.

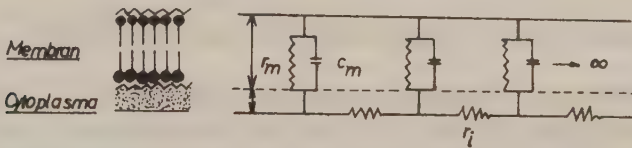


Abb. 28: Elektrisches Ersatzschema für eine Herzmuskelfaser

(18, 52, 77, 78)

r_m = Membranwiderstand

c_m = Membrankapazität

r_i = Längswiderstand des Cytoplasmas

Wie die Untersuchungen von MEVES u. VOELKNER (79) am M. sartorius zeigen konnten, nimmt in saurer Ringerlösung mit ansteigender $H^{\oplus}$ -Konzentration der Membranwiderstand r_m zu. Der Innenwiderstand r_i und die Ausbreitungsgeschwindigkeit eines elektrotonischen Potentials (künstliche Anhebung des Membranpoten-

tials durch einen Polarisationsstrom) nehmen dagegen ab. Dieser Befund weist daraufhin, daß pH-Änderungen im Organbad sich bis in die Biophase hinein auswirken. Eine zusätzliche Bestätigung für dieses Verhalten ergaben auch die Untersuchungen von MÜLLER-MOHNSEN (101) am Ranvierschen Schnürring. Dabei zeigte sich, daß mit einer Änderung des pH-Wertes in der extrazellulären Flüssigkeit starke Veränderungen der stationären Kennlinien der Membran des Ranvier-Knotens verbunden sind. In unseren am Herzmuskel durchgeführten Versuchen wurde die Wirkung der pH-Änderung in der Biophase durch einen Anstieg der Ausgangsleitungsgeschwindigkeit erkennbar (Abb. 29). Da die Geschwindigkeit der Erregungsleitung eine Funktion des spezifischen Membranwiderstandes r_m ist (80), steht der beobachtete Anstieg der LG mit abnehmender H^+ -Konzentration in guter Übereinstimmung mit obigen Befunden, wonach sich der Membranwiderstand mit ansteigendem pH erniedrigt. Dies wird auf eine Zunahme der negativen Nettoladung als Folge der steigenden Entladung positiver Festionen zurückgeführt.

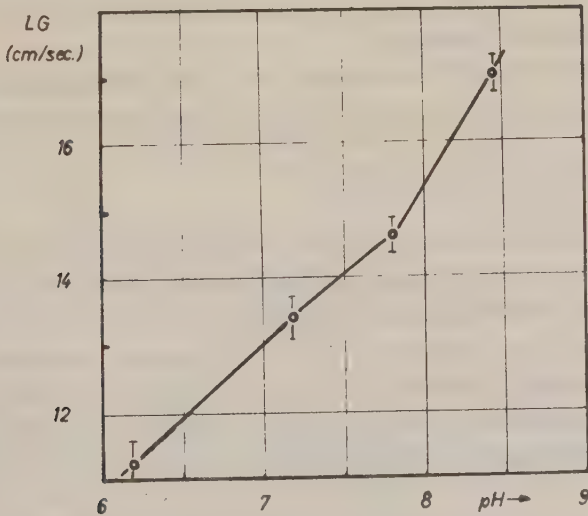


Abb. 29: Ausgangsleitungsgeschwindigkeit im Ventrikelstreifen in Abhängigkeit vom pH der Badflüssigkeit (98)

Mittelwertskurve; Reizfrequenz 0,5 Hz, 2 msec

Abszisse: pH der Badflüssigkeit

Ordinate: Ausgangsleitungsgeschwindigkeit (cm/sec)

Mit Zunahme des pH der Badflüssigkeit geht ein Anstieg der LG parallel. Dies kann als Hinweis dafür gedeutet werden, daß sich der pH der Biophase dem pH in der Badflüssigkeit angleicht.

Unsere Befunde stimmen auch mit den jüngsten Untersuchungen von DROUIN u. THE (81) überein. Danach nimmt in der Membran des Ranvierschen Schnürrings mit Zunahme der extrazellulären H^+ -Konzentration die Na^+ -Leitfähigkeit ab. Damit ist eine Verminderung des Na^+ -Einwärtsstroms verbunden.

a) N-(N-Dimethylalanyl)- und N-(N-Dimethylphenylalanyl)-2,6-dimethylaniline

Die Bedeutung der hydrophoben Wechselwirkung und der Ionenbindung für die Verknüpfung von Lokalanästhetika mit Strukturen der erregbaren Zellmembran wird in diesem Abschnitt am Beispiel der enantiomeren N-(Aminoacyl)-2,6-dimethylaniline untersucht. Wir gehen dabei von der Annahme aus, daß die Bindung therapeutisch gebräuchlicher Lokalanästhetika über mindestens zwei Strukturelemente erfolgt, nämlich über die protonisierte Dialkylaminogruppe (Ionenbeziehung) und den aromatischen Rest (hydrophobe Wechselwirkung). Es ist anzunehmen, daß dadurch - ähnlich der Bindung von Ca^{++} an anionische Zentren - eine "Stabilisierung" der Ruhekonformation hervorgerufen wird. Beim Ausfall eines bindenden Zentrums (im vorliegenden Versuch durch Entladung der Dimethylammoniumgruppe) ist mit einer starken Beeinträchtigung der Wirkung zu rechnen.

Durch die Entladung der Dimethylammoniumgruppe wird die Bindungsenergie auf die schwache hydrophobe Wechselwirkung der beiden N-Methylgruppen reduziert.

N-(N-Dimethylalanyl)-2,6-dimethylaniline

Die Unterschiede in der Wirkung von Antipoden erklären sich nach der Theorie von EASSON u. STEDMAN (42) mit einer Drei-Punkte-Beziehung zur komplementären Membranstruktur. Neben den verknüpfenden Dimethylammonium- und Dimethylanilin-Resten tritt beim stärker wirkenden D-Ala-A die CH_3 -Gruppe in eine schwache hydrophobe Wechselwirkung zum Strukturprotein (3-Punkte-Beziehung). Im Fall der L-konfigurierten Verbindung ist eine Wechselbeziehung durch diese CH_3 -Gruppe aus sterischen Gründen nicht möglich (2-Punkte-Beziehung, Abb. 31).

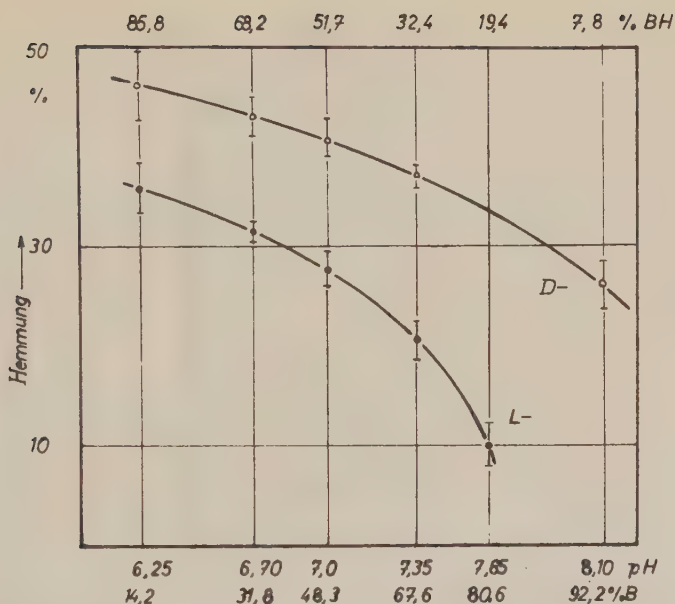


Abb. 30: Hemmung der Erregungsleitung im Ventrikelstreifen des Froschherzens durch Enantiomere L-Ala-A und D-Ala-A in Abhängigkeit vom pH der Testlösung.

Konzentration: 41,4 $\mu\text{Mol/l}$

Abszisse: pH der Badflüssigkeit

Ordinate: Prozentuale Änderung der LG gegenüber dem Ausgangswert

Bei der Testung der enantiomeren N-(N-Dimethylalanyl)-2,6-dimethylaniline wurde die $\text{H}^{\oplus}$ -Konzentration in der Badflüssigkeit kontinuierlich verringert (Abb. 30). Wir beobachteten dabei einen fortschreitenden Wirkungsabfall, der mit dem Ausfall elektrostatischer Bindungen (zur "Rezeptorstelle" B) erklärbar ist. Bei pH 8,1, wo bereits 92 % der beiden Enantiomere als freie Basen vorliegen, ist nur mehr eine schwache Wirkung (D-Ala-A) bzw. weitgehender Wirkungsverlust (L-Ala-A) feststellbar. Die für eine Wirkung erforderliche 2-Punkte-Beziehung ist nur bei D-Ala-A-Ba-

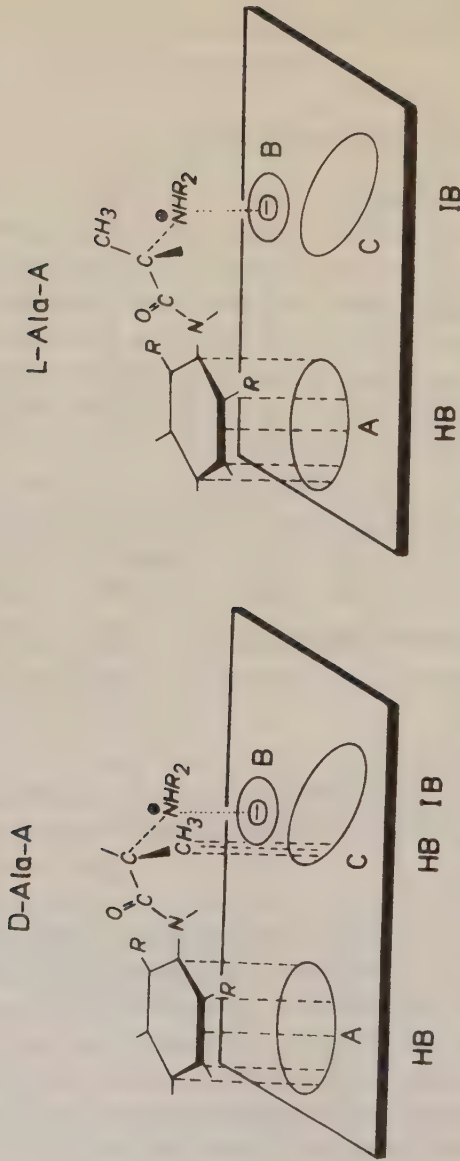


Abb. 31: Wechselbeziehung der enantiomeren N-(N-Dimethylalanyl)-2, 6-dimethylalanine mit komplementären Membranstrukturen
 HB = hydrophobe Bindung
 IB = Ionenbindung
 R = -CH₃

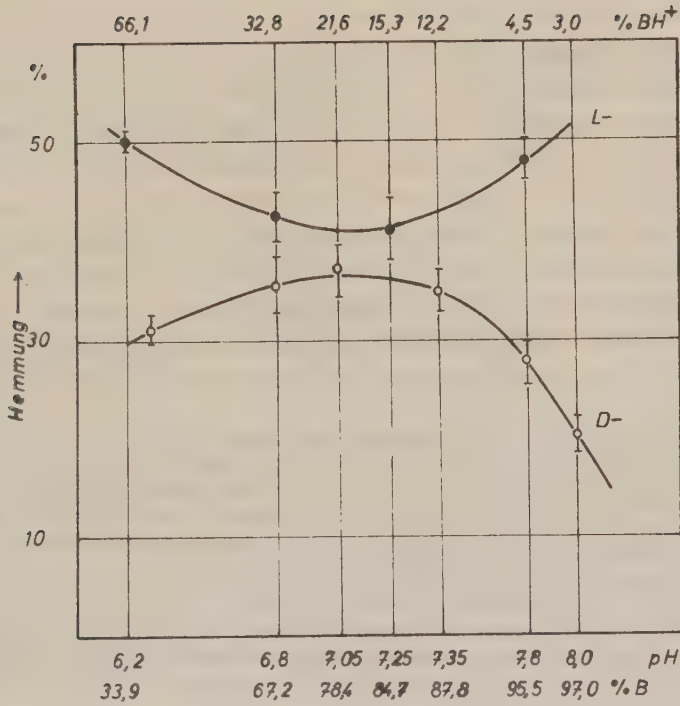


Abb. 32: Hemmung der Erregungsleitung im Ventrikelstreifen des Froschherzens durch die Enantiomere L-Phe-A und D-Phe-A in Abhängigkeit zum pH-Wert der Testlösung. Konzentration: 24 $\mu\text{Mol/l}$

Abszisse: pH der Badflüssigkeit

Ordinate: Prozentuale Änderung der LG gegenüber dem Ausgangswert

se, wenn auch abgeschwächt, möglich (starke HB^{+} zu A, schwache HB zu C).

N-(N-Dimethylphenylalanyl)-2, 6-dimethylaniline

Beim stärker wirkenden L-Phe-A befindet sich der Benzolkern der Aminosäure in einer für die hydrophobe Bindung günstigen Stellung. Er ermöglicht eine 3-Punkte-Beziehung der protonisierten Base zum Strukturprotein und vermittelt eine stabile 2-Punkte-Bindung (starke HB zu A u. C) nach Entladung der Dimethylammoniumgruppe (Abb. 33). Die L-Phe-A-Base ist daher wirksam. Bei der enantiomeren Verbindung D-Phe-A ist infolge der entgegengesetzten Konfiguration der Benzolring so angeordnet, daß eine hydrophobe Wechselbeziehung zu C behindert ist (2-Punkte-Beziehung der protonisierten Base). Eine pH-Änderung in den alkalischen Bereich führt zu einer Entladung der Dimethylammoniumgruppe und damit zum Wirkungsabfall (Abb. 32). Der Phenylrest der Aminosäure kann aus sterischen Gründen die für eine Wirkung der Base erforderliche Beziehung zu C (2-Punkte-Beziehung) nur schlecht aufnehmen.

Um auszuschließen, daß der Wirkungsabfall von D- und L-Ala-A bzw. D-Phe-A bei pH 8 durch Molekül-Assoziation hervorgerufen wird, prüften wir die N-(Aminoacyl)-2, 6-dimethylaniline auf ihre Oberflächenaktivität in Abhängigkeit vom pH.

Nach Untersuchungen von ECKERT (85) soll die Wirkungsabnahme bei höheren Gliedern homologer Reihen auf der Bildung von Molekül ASSOZIATEN beruhen, die im Gegensatz zu Monomeren nur schlecht zum Wirkort diffundieren.

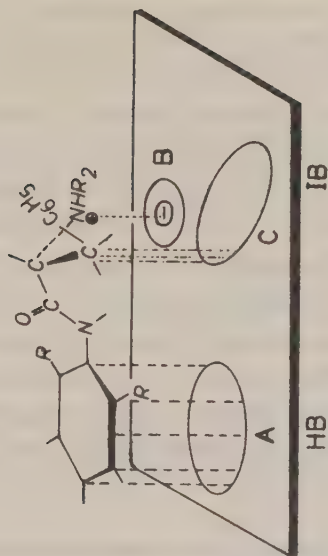
Die untersuchten Verbindungen zeigen wie erwartet mit zunehmendem pH eine Erniedrigung der Oberflächenspannung. Die aromatischen Verbindungen D- und L-Phe-A waren stärker oberflächenaktiv und biologisch wirksamer⁺⁺. Im Konzentrationsbereich der biologischen Versuche konnte jedoch keine Molekül-Assoziation beobachtet werden. Sie scheidet daher als Ursache für den Wirkungsabfall von D-Ala-A-, L-Ala-A- und D-Phe-A-Base aus.

Aufgrund dieser Ergebnisse muß neben der Dimethylaminogruppe (Ionenbeziehung) dem Phenylrest (hydrophobe Wechselbeziehung) eine besondere Bedeutung bei der Bindung der N-(Aminoacyl)-2, 6-dimethylaniline an Strukturen der erregbaren Zell-

⁺) HB = hydrophobe Bindung

⁺⁺) Ein symbates Verhalten von lokalanästhetischer Wirkung⁻ und Oberflächenaktivität wurde auch von BÜCHI (31) festgestellt.

D-Phe-A



L-Phe-A

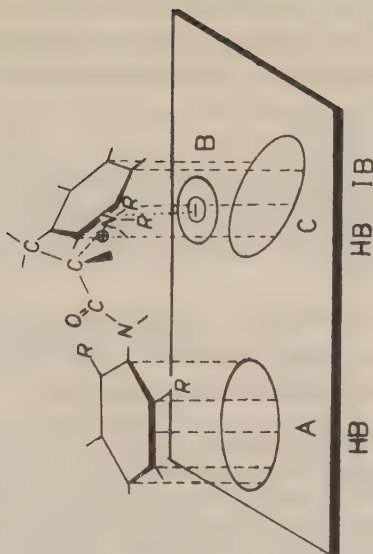


Abb. 33: Wechselbeziehung der enantiomeren N-(N-Dimethylphenylalanyl)-2,6-dimethylaniline mit komplementären Membranstrukturen
 HB = hydrophobe Bindung IB = Ionenbindung R = CH₃

membran zugesprochen werden ^{†)}. Die starke Abhängigkeit der Wirkung von der Konfiguration, die besonders nach der Entladung der Dimethylammoniumgruppe sichtbar wird, deutet auf den Aminosäurerest als einem wesentlichen Teil bei der Wechselbeziehung mit Strukturproteinen hin.

Nach ARIENS (70) bedingt ein Asymmetriezentrum in dem für die Rezeptorwechselbeziehung wichtigen Molekülanteil eine starke Abhängigkeit der Wirkung von der Konfiguration. Man beobachtet in solchen Fällen ein großes Wirkungsverhältnis der Stereoisomeren.

Liegt das Asymmetriezentrum dagegen in einer Position, die für die Auslösung der biologischen Wirkung von untergeordneter Bedeutung ist, so zeigen beide Enantiomere eine gleiche oder nur wenig differierende Wirkungsstärke.

Diese Feststellungen stützen sich auf Untersuchungen mit stereoisomeren Acetylcholinanalogen und von diesen abgeleiteten Anticholinergika. Die enantiomeren Acetyl- β -methylcholine besitzen ein Aktivitätsverhältnis von 320. Die aktivere Form entspricht bezüglich ihrer Wirkungsstärke dem Acetylcholin. Es ist wahrscheinlich, daß bei dieser Verbindung die CH_2 -Gruppe bei der Wechselbeziehung vom Rezeptor abgewandt ist, während beim schwächer wirkenden Enantiomer CH_3 die Annäherung erschwert.

Interessanterweise zeigen die enantiomeren, anticholinergischen Benzilsäure- β -methylcholinester keine nennenswerten Wirkungsunterschiede. Der Cholinanteil scheint bei der Rezeptorwechselbeziehung dieser Verbindungen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Seine Aufgabe besteht vermutlich in einer Behinderung der Kontaktaufnahme von Acetylcholin zum Rezeptor. Für die Bindung der Anticholinergika an den Rezeptor kommt dem Säureanteil die wesentliche Bedeutung zu, das zeigen Wirkungsunterschiede der bezüglich ihrer Säurereste enantiomeren Cyclohexylphenylglykolester der β -Methylcholine. Sie reagieren durch hydrophobe Wechselwirkung über ihre zyklischen Reste mit dem umgebenden Areal des Acetylcholin Rezeptors.

Ganz ähnlich dürften die Verhältnisse bei den hier untersuchten N-(Aminoacyl)-2,6-dimethylanilinen liegen. Vermutlich reagieren auch sie mit dem umgebenden Rezeptorareal, d. h. mit benachbarten Stellen der Ionenkanäle, worauf auch die elektrophysiologischen Versuche hinweisen. Es kommt zu einer Stabilisierung der erregbaren Membran und so zu einer Hemmung der Reizleitung. Dieser Vorgang erfordert eine Mehrpunktebeziehung; bei den therapeutisch gebräuchlichen Lokalanästhetika in der Regel eine

^{†)} Aminosäureamide aliphatischer Amine besitzen nur eine geringe lokalanästhetische Wirkung (84).

Ionenbeziehung und eine hydrophobe Bindung. Die Ionenbeziehung kann, wie die Versuche mit freien Basen zeigen, durch eine hydrophobe Bindung ersetzt werden. Hier wird die Beziehung zu den N-freien Lokalanästhetika sichtbar. Die Frage nach der Wirkform der Lokalanästhetika ist dahingehend zu beantworten:

Lokalanästhetika wirken in erster Linie als Ionen. Die leitungshemmende Wirkung der Lokalanästhetika-Base ist von der Anwesenheit längerer Alkyl- oder Arylreste abhängig. Sie ersetzen die elektrostatische Bindung zu Strukturproteinen durch hydrophobe Bindungskräfte.

b) N-(N-Dimethylphenylalanyl)-ephedrine

Im vorhergehenden Abschnitt wurde gezeigt, daß Lokalanästhetika mit zwei aromatischen Resten geeigneter räumlicher Anordnung auch als freie Basen wirksam sind.

Auch bei N-(N-Dimethylphenylalanyl)-ephedrinen, die im Molekül zwei Phenylreste aufweisen, ist eine Stabilisierung von Strukturproteinen und damit eine Hemmung der Erregungsleitung nach Entladung der protonisierten Dimethylaminogruppe denkbar. Die Prüfung der vier Enantiomerenpaare am Ventrikelstreifen erfolgte im pH-Bereich von 6,2 bis 8,3. Die $p'K_a$ -Werte der N-(N-Dimethylphenylalanyl)-ephedrine liegen zwischen 7,38 und 7,54. Sie sind bei pH 6,2 zu etwa 95 %, bei pH 8,3 dagegen nur zu etwa 13 % protonisiert ⁺⁾ . Alle Verbindungen sind als Basen und Ionen wirksam. Bei DL ist die Wirkung der freien Base wesentlich größer als die des Kations. Der Antipode LD zeigt ein ähnliches Verhalten, doch sind die Wirkungsunterschiede von Base und Kation weniger stark ausgeprägt. Ein Vergleich beider Wirkungskurven zeigt, daß nicht nur zwischen den enantiomeren Lokalanästhetika-Kationen sondern auch zwischen den enantiomeren Basen erhebliche Wirkungsunterschiede bestehen.

⁺⁾ Für die Wirkung der freien Basen werden die Werte bei pH 8,3 zugrundegelegt. Eine Testung bei höheren pH-Werten führt zu einer fortlaufenden Schädigung des Präparates.

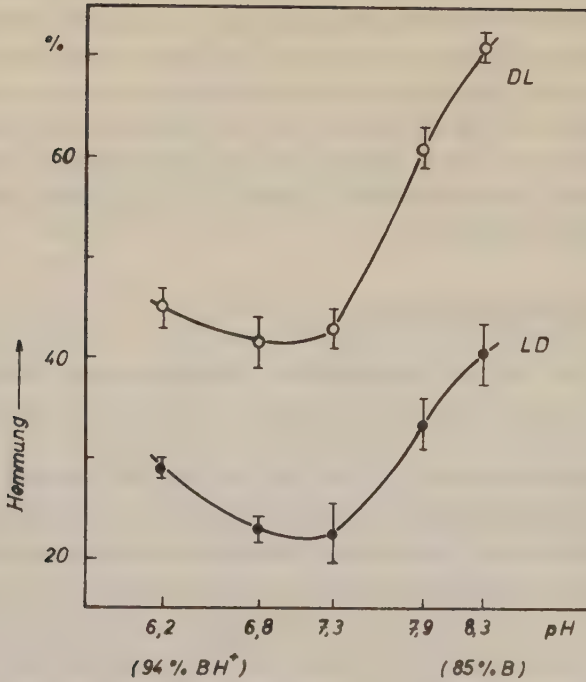


Abb. 34: Hemmung der Erregungsleitung im Ventrikelstreifen des Froschherzens durch die Enantiomeren N-(D-N-Dimethylphenylalanyl)-L-ephedrin und N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-D-ephedrin in Abhängigkeit vom pH der Testlösung.

Konzentration: 50 $\mu\text{Mol/l}$

Abszisse: pH der Badflüssigkeit

Ordinate: Prozentuale Änderung der LG gegenüber dem Ausgangswert

Beim Antipodenpaar LL/DD (2a/2b) wurden ähnliche Ergebnisse erzielt. Beide Substanzen zeigen mit steigendem pH eine Zunahme der Wirkung, d.h. die freien Basen besitzen eine stärkere Hemmwirkung auf die Reizleitung als die Ionen.

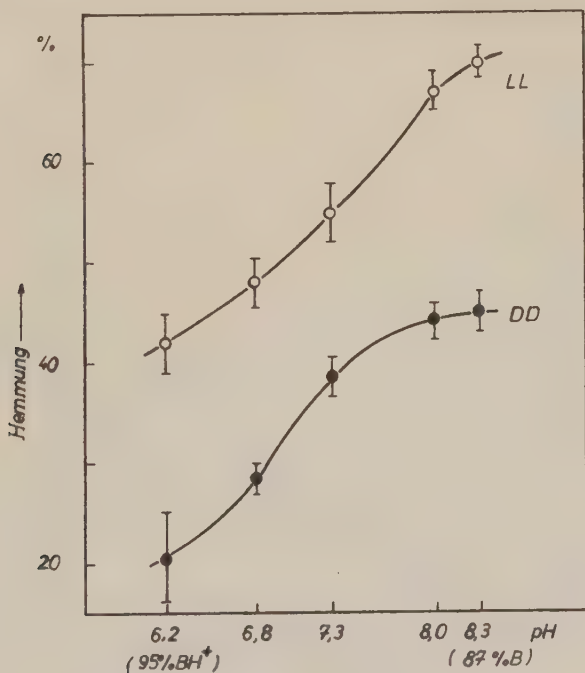


Abb. 35a: Hemmung der Erregungsleitung im Ventrikelstreifen des Froschherzens durch die Enantiomeren N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-L-ephedrin und N-(D-N-Dimethylphenylalanyl)-D-ephedrin in Abhängigkeit vom pH der Testlösung.

Konzentration: 40 $\mu\text{Mol/l}$

Abszisse: pH der Badflüssigkeit

Ordinate: Prozentuale Änderung der LG gegenüber dem Ausgangswert

Im Falle des Enantiomerenpaares DL ψ /LD ψ (3a/3b) konnte bei pH 6,2 keine unterschiedliche Hemmung der Isomeren festgestellt werden. Mit sinkender H⁺-Konzentration nahm die Wirkung von DL ψ in stärkerem Maß als die von LD ψ zu. Die enantiomeren Lokalanästhetika-Ionen zeigen keine, die enantiomeren Basen dagegen deutliche Wirkungsunterschiede.

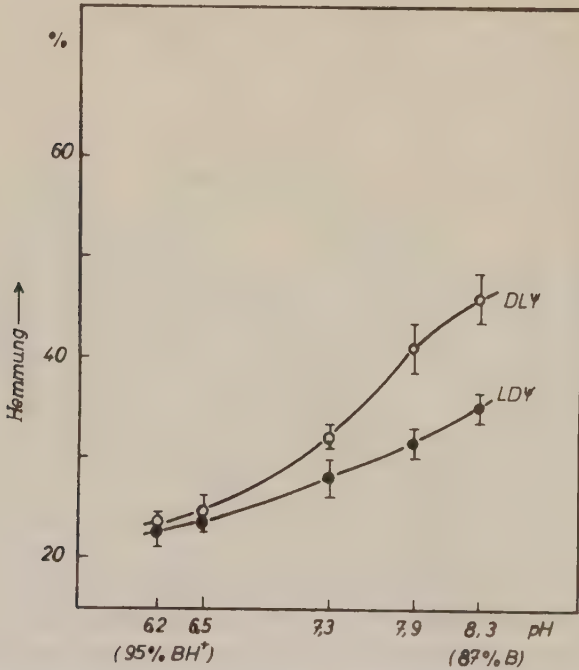


Abb. 35b: Hemmung der Erregungsleitung im Ventrikelstreifen des Froschherzens durch die Enantiomeren N-(D-N-Dimethylphenylalanyl)-L ψ -ephedrin und N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-D- ψ -ephedrin in Abhängigkeit vom pH der Testlösung.

Konzentration: 40 μ Mol/l

Abszisse: pH der Badflüssigkeit

Ordinate: Prozentuale Änderung der LG gegenüber dem Ausgangswert

Auch bei DD Ψ /LL Ψ (4a/4b) wurde ein Wirkungsanstieg mit steigendem pH-Wert beobachtet. Die enantiomeren Ionen und Basen weisen etwa gleiche Wirkungsunterschiede auf.

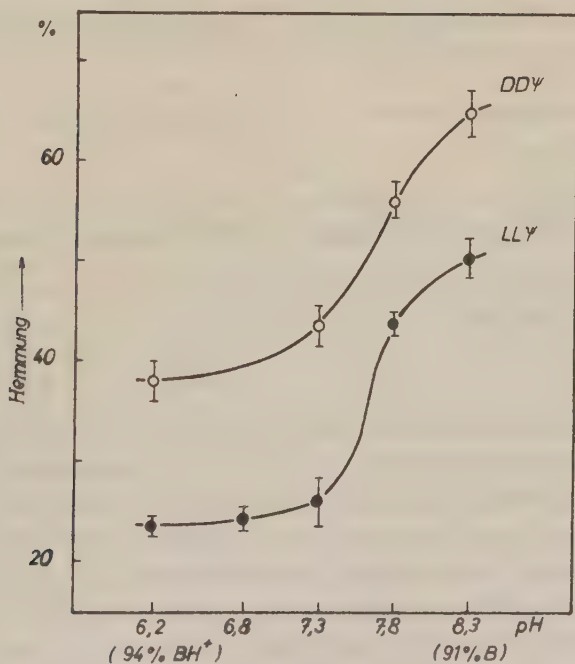


Abb. 36: Hemmung der Erregungsleitung im Ventrikelstreifen des Froschherzens durch die Enantiomeren N-(D-N-Dimethylphenylalanyl)-D- Ψ -ephedrin und N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-L- Ψ -ephedrin in Abhängigkeit vom pH der Testlösung.

Konzentration: 80 μ Mol/l

Abszisse: pH der Badflüssigkeit

Ordinate: Prozentuale Änderung der LG gegenüber dem Ausgangswert

Der Vergleich der ID_{50} -Werte der N-(N-Dimethylphenylalanyl)-ephedrin-Ionen und -Basen führt zu folgenden Feststellungen:

1. Die im Aminosäureanteil D-konfigurierten Verbindungen sind in der überwiegenden Zahl der Fälle wirksamer, wie der Vergleich der enantiomeren (Tab. 7) und diastereomeren (Tab. 7a) Paare zeigt.
2. In allen Fällen hemmen die Basen die Erregungsleitung stärker als die entsprechenden Ionen (Abb. 38).
3. Die enantiomeren Basen und Ionen zeigen mit Ausnahme der DL ψ /LD ψ -Ionen, die sich nicht signifikant unterscheiden, deutliche Wirkungsunterschiede.
4. Bezüglich der Wirkungsabstufung ergibt sich bei den Basen eine andere Reihenfolge als bei den Ionen.

Zu 1)

Die in den meisten Fällen beobachtete stärkere Wirkung der im Aminosäureanteil D-konfigurierten Verbindungen (s. Tab. 7 u. 7a) deutet auf die dominierende Rolle des Dimethylphenylalanin-Restes bei der Wechselwirkung mit Membranstrukturen hin. Im Falle von LL und DL scheint jedoch auch dem Aminoalkohol-Anteil (L-Ephedrin) eine wesentliche Bedeutung bei der Verknüpfung zuzukommen. Das zeigt die Tatsache, daß diese beiden L-Ephedrin-Verbindungen in ihrer Wirkung allen anderen Diastereomeren deutlich überlegen sind. Ein weiterer Hinweis ist, daß die bei den übrigen Diastereomerenpaaren (LD/DD, LI ψ /DL ψ' und LD ψ /DD ψ') beobachteten Wirkungsunterschiede im Falle von LL/DL (Tab. 7a) nicht signifikant sind. Aufgrund dieser Befunde scheint bei N-(N-Dimethylphenylalanyl)-ephedrinen ebenso wie bei N-(Aminoacyl)-2,6-dimethylanilinen der Aminosäureanteil des Moleküls eine dominierende Rolle bei der Bindung an Membranproteine zu spielen. Die Sonderstellung der L-Ephedrin-Derivate wirft die Frage auf, ob die beobachtete Affinität mit dem Testobjekt Herzmuskel in Zusammenhang zu bringen ist. Unter den vier stereoisomeren Ephedrinen zeigt nach BRANDT (86) L-Ephedrin am Meerschweinchen-Papillarmuskel die stärkste positiv inotrope und Adrenalin potenzierende Wirkung.

Tabelle 7: Hemmung der Erregungsleitung im Ventrikelstreifen des Froschherzens (ID_{50}) durch enantiomere Ionen- und Basenpaare bei N-(Aminoacyl)-ephedrinen. Die Ranglistenwertung ergibt sich durch Anordnung der Isomeren nach fallender Wirkung (=anstiegende ID_{50}).

ID_{50} [$\mu\text{Mol/l}$] der enantiomeren Ionenpaare (pH 6, 2)				
1a)	LD	150, 0	3a)	LD Ψ
b)	DL	64, 0	b)	DL ∇
2a)	LL	60, 0	4a)	LL ∇
b)	DD	190, 0	b)	DD Ψ
				173, 0
				168, 0
				340, 0
				148, 0

Platzziffer	1	2	3	4	5	6	7	8
Verbindung	LL (2a)	DL (1b)	DD Ψ (4b)	LD (1a)	DL Ψ (3b)	LD Ψ (3a)	DD (2b)	LL Ψ (4a)
ID_{50} [$\mu\text{Mol/l}$]	60, 0	64, 0	148, 0	150, 0	168, 0	173, 0	190, 0	340, 0

ID_{50} [$\mu\text{Mol/l}$] der enantiomeren Basenpaare (pH 8, 3)				
1a)	LD	64, 0	3a)	LD Ψ
b)	DL	24, 0	b)	DL Ψ
2a)	LL	23, 0	4a)	LL Ψ
b)	DD	46, 0	b)	DD Ψ
				62, 0
				44, 0
				78, 0
				52, 0

Platzziffer	1	2	3	4	5	6	7	8
Verbindung	LL (2a)	DL (1b)	DL Ψ (3b)	DD (2b)	DD Ψ (4b)	LD Ψ (3a)	LD (1a)	LL Ψ (4a)
ID_{50} [$\mu\text{Mol/l}$]	23, 0	24, 0	44, 0	46, 0	52, 0	62, 0	64, 0	78, 0

Tabelle 7a: Hemmung der Erregungsleitung im Ventrikelstreifen des Froschherzens (ID_{50}) durch diastereomere Ionen- und Basenpaare bei N-(Aminoacyl)-ephedrinen

ID_{50} [$\mu\text{Mol/l}$] der diastereomeren Ionenpaare (pH 6, 2)					
LL	60, 0	LD	150, 0	LL Ψ	340, 0
DL	64, 0	DD	190, 0	DL Ψ	168, 0
				LD Ψ	173, 0
				DD Ψ	148, 0

ID_{50} [$\mu\text{Mol/l}$] der diastereomeren Basenpaare (pH 8, 3)					
LL	23, 0	LD	64, 0	LL Ψ	78, 0
DL	24, 0	DD	46, 0	DL Ψ	44, 0
				LD Ψ	62, 0
				DD Ψ	52, 0

Zu 2)

Die in allen Fällen stärkere Wirkung der Base kann wahrscheinlich auf eine Störung der energetisch günstigeren hydrophoben Wechselwirkung durch die Ionenbindung zurückgeführt werden. Sie beeinträchtigt die Näherung der Phenylreste zum zugehörigen Rezeptorareal. Beim Enantiomerenpaar LD ψ /DL ψ (3a/3b) ist diese Behinderung so ausgeprägt, daß Wirkungsunterschiede nicht erscheinen. Die stärkere Basenwirkung kann weiterhin durch eine Beteiligung der zwei am Stickstoff stehenden CH₃-Gruppen bei der hydrophoben Wechselbeziehung erklärt werden (die unterschiedliche Wirkung enantiomerer Basen deutet darauf hin, vgl. hierzu S.63). Die protonisierte Base besitzt eine stabile Hydrathülle, die eine solche Wechselwirkung eventuell behindert.

Im Gegensatz zu den enantiomeren Aniliden des Phenylalanins sind bei den N-(Aminoacyl)-ephedrinen alle enantiomeren Basen wirksam; d.h. hier können alle acht Verbindungen Konformationen einnehmen, die eine hydrophobe Wechselwirkung über beide Phenylreste gestatten. Diese freie Drehbarkeit, die durch die längere Zwischenkette ermöglicht wird, zeigt sich bei Betrachtung der Kalottenmodelle ⁺⁾ .

Zu 3)

Die Beobachtung, daß sich sowohl die enantiomeren Basen als auch Ionen in ihrer Wirkung unterscheiden, deutet auf eine 3-Punkte-Beziehung von Ion und Base bei der Verknüpfung mit dem Rezeptorzentrum hin. Die Verknüpfung mit B erfolgt im Falle der protonisierten Basen über eine Ionenbeziehung; bei den freien Basen dagegen durch eine hydrophobe Wechselwirkung der N(CH₃)₂-Gruppe.

Zu 4)

Die Feststellung, daß hinsichtlich der Wirkungsabstufung bei den Basen und Ionen eine andere Reihenfolge auftritt, erklären wir wie folgt:

Die Basen nehmen bei der Wechselwirkung mit komplementären Membranstrukturen eine andere Konformation, d.h. eine für die Bindung günstigere als die entsprechenden Ionen ein. Dies zeigt sich in der beobachteten stärkeren Wirkung der Basen und

⁺⁾ Atomkalotten nach STUART u. BRIEGLEB, Hersteller E. Leybold, Köln-Bayental

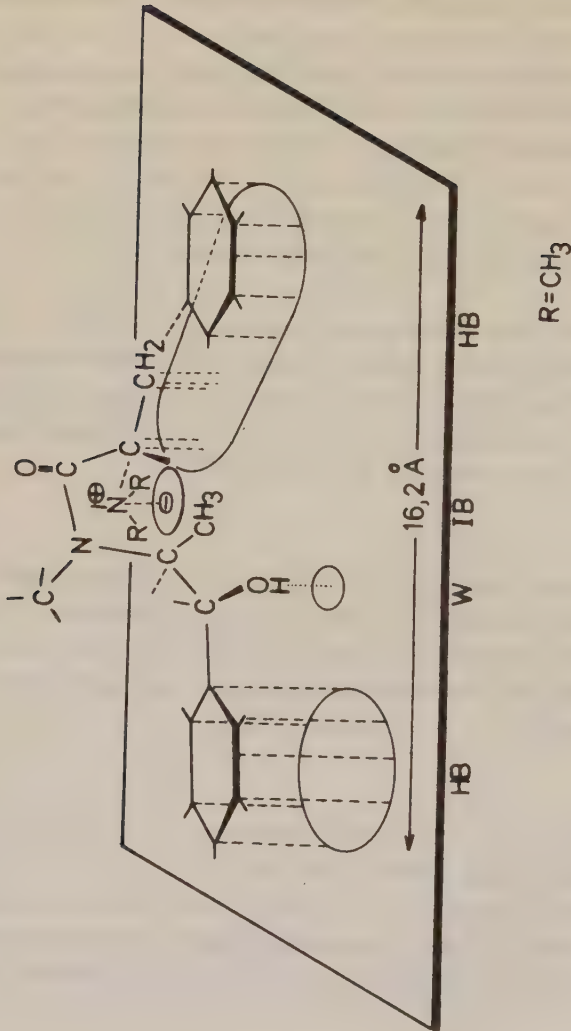


Abb. 37: Wechselbeziehung von N-(D-N-Dimethylphenylalanyl)-L-alanin mit komplementären Membranstrukturen.

Die Längen wurden an Dreiding-Modellen vermessen (approximativer Maßstab).

HB = hydrophobe Bindung

IB = Ionenbindung

W = H-Brückenbindung

der veränderten Wirkungsreihenfolge. Im Fall der L-Aminosäure kommen im Vergleich zu den Isomeren der D-Reihe diese Effekte deutlicher zum Tragen (Abb. 38, rechts: Angleichung der Werte bei LD ψ -, LD- und LL ψ -Base).

Die Befunde von FUCHSBERGER (29), wonach die Wirkungsunterschiede der Isomeren-Reihe auf den dirigierenden Einfluß des asymmetrischen C-Atoms im Aminosäure-anteil zurückzuführen sind, müssen aufgrund der vorliegenden Ergebnisse modifiziert werden:

Der Aminosäureanteil scheint zwar eine wesentliche Rolle zu spielen, jedoch wird das Ausmaß der Pharmakon-Rezeptor-Wechselbeziehung durch die Konfiguration sämtlicher Asymmetriezentren (dies zeigt besonders die Rolle des L-Ephedrins) beeinflußt.

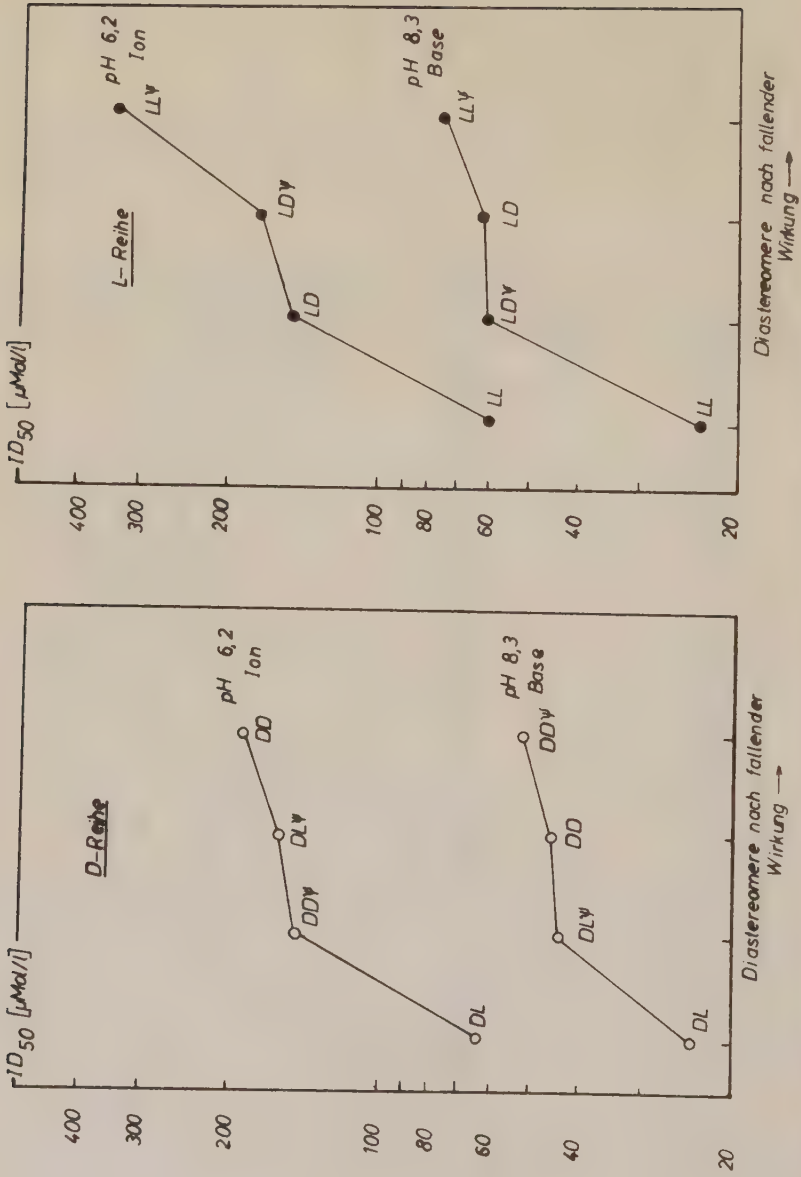


Abb. 38: ID 50-Werte der im Aminosäure-Teil D- bzw. L-konfigurierten diastereomeren N-(N-Dimethylphenylalanyl)-ephedrine.

E. Zur Synthese der N-(N-Dimethylphenylalanyl)-ephedrine nach dem Anhydrid-Verfahren

Ausgangspunkt dieser Untersuchungen ist die Beobachtung, daß bei den Umsetzungen von rac. N-(Dimethylphenylalanyl)-carbäthoxyanhydrid mit optisch aktiven Ephedrinen oder Ψ Ephedrinen diastereomere N-(N-Dimethylphenylalanyl)-ephedrine in unterschiedlichen Mengen entstehen (56).

Eine solche stereoselektive Acylierung von Aminen durch O-Aminoacyl-O'-äthyl-carbonate wurde auch von HERLINGER, KLEINMANN u. UGI (87) beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wird die stereoselektive Synthese der N-(N-Dimethylphenylalanyl)-ephedrine am Beispiel der Umsetzung von N-(D, L-N-Dimethylphenylalanyl)-carbäthoxyanhydrid mit L- Ψ -Ephedrin untersucht.

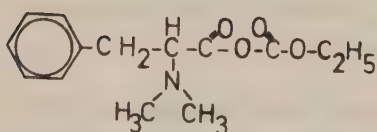
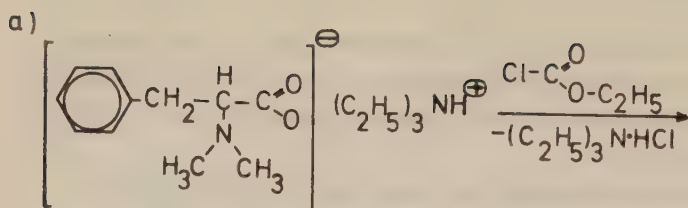
Zur Durchführung der Studien war es erforderlich, Voruntersuchungen zur quantitativen Auftrennung und Bestimmung des Reaktionsgemisches, zur Ermittlung der optimalen Bedingungen für die Herstellung des Anhydrids und für die Aminolyse vorzunehmen.

I. Untersuchungen zur quantitativen Durchführung der Umsetzung.

Es wurde von folgender Versuchsanordnung (Standardversuch) ausgegangen:

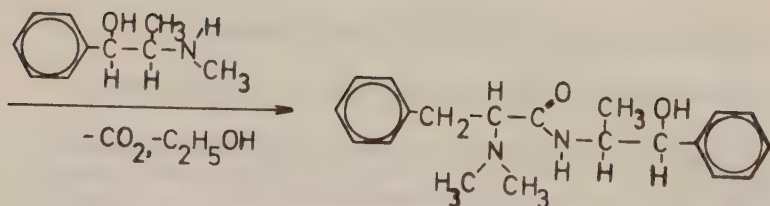
Äquimolare Mengen rac. N-Dimethylphenylalanins, Chlorameisensäureäthylesters und Triäthylamins werden in Tetrahydrofuran bei -15°C zum gemischten Anhydrid (I) umgesetzt. Nach einer Aktivierungszeit von 4 Std. läßt man mit einer äquimolaren Menge L- Ψ -Ephedrin zu den diastereomeren Amid (II) reagieren (Reaktionsdauer 15 Min. bei -15°C , anschließend 2 Std. bei Raumtemperatur, Konzentration 0,3 Mol/l).

Die mit diesem Verfahren erzielten Ausbeuten an N-(D-N-Dimethylphenylalanyl)-L- Ψ -ephedrin (DL Ψ , ca. 10%) und N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-L- Ψ -ephedrin (LL Ψ , ca. 5%) waren im Gegensatz zu ähnlichen Umsetzungen in der Peptidchemie gering. Das Reaktionsgemisch enthielt weiterhin N-(Carbäthoxy)-L- Ψ -ephedrin (III, ca. 48%) und erhebliche Mengen nicht umgesetztes L- Ψ -Ephedrin (ca. 37%). Ähnlich ungünstige Ausbeuten für N-(Aminoacyl)-ephedrine fand ENDRES (88) bei der Reaktion von N-(Phthalyl)-aminosäureanhydriden mit Ephedrin und Ψ Ephedrin. Als Ursache für die unvollständige Umsetzung des L- Ψ -Ephedrins sind eine zu geringe Anhydridbildung und zu kurze Aminolysezeiten zu diskutieren.



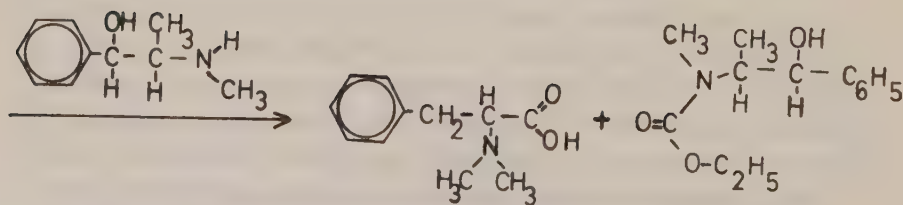
(I)

b)



(II)

b')



(III)

1. Analytische Bestimmung der Einzelkomponenten im Reaktionsgemisch

Zur Bestimmung der vier Umsetzungsprodukte LL Ψ , DL Ψ , L- Ψ -Ephedrin und N-(Carbäthoxy)-L Ψ -ephedrin ("Urethan") wird das durch Abdampfen gewonnene Syntheserohprodukt nach Zusatz von 3n NaOH in Chloroform aufgenommen und das Basengemisch anschließend in 8n HCl geschüttelt. Nach Abziehen der Chloroform-Phase am Rotationsverdampfer erhält man als einzige Substanz Urethan (nachgewiesen durch DC Vergleich mit analysenreinem N-(Carbäthoxy)-L Ψ -ephedrin). Die Urethanmenge wurde gravimetrisch bestimmt.

Um nachzuweisen, daß unter den Aufarbeitungsbedingungen kein freies L- Ψ -Ephedrin aus Urethan gebildet wird, inkubierten wir 0,2 g Urethan in 10 ml H₂O, 0,1 n NaOH und 0,1 n HCl 2 Std. bei Raumtemperatur und prüften mittels DC auf L- Ψ -Ephedrin. Es konnte keine Zersetzung nachgewiesen werden.

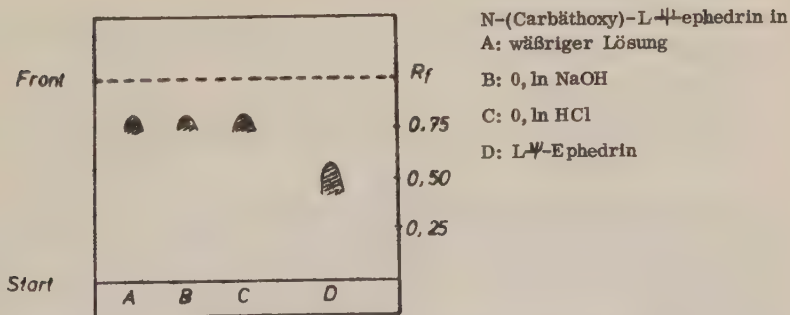


Abb. 39: Dünnschichtchromatographischer Nachweis der Stabilität von N-(Carbäthoxy)-L- Ψ -ephedrin.
 Adsorbens: Kieselgel GF₂₅₄, Merck
 Fließmittel: Methanol/Chloroform/Cyclohexan/25% Ammoniak (30/50/30/5 Vol. Tle.)
 Sprühmittel: Jod-Jodkali-Lösung

Das nach der Extraktion von Urethan in der HCl-Phase verbleibende Basengemisch wird im Natronalkalischen mit Chloroform ausgeschüttelt, die Chloroformphase am Rotationsverdampfer abgezogen und das verbleibende Basengemisch einem 120-stufigen Craig-Grundprozeß im Lösungsmittelsystem Chloroform/Methanol/0,1m Citratpuffer pH 4,5 (10 : 1 : 9 Vol. Tle.) unterworfen. Die Verbindung LL Ψ befindet sich in den Elementen 5 - 17 ($K = 16,67$), DL Ψ in 50 - 70 ($K = 2,85$) und L- Ψ -Ephedrin in den Elementen 95 - 120 ($K = 0,14$).

Zur quantitativen Bestimmung der drei Komponenten wurden die entsprechenden Fraktionen vereinigt und durch Zugabe von 3n NaOH die Base in Chloroform geschüttelt. In einem aliquoten Teil der Chloroformlösung wurde das Amin mit 0,01n p-Toluolsulfonsäure und Dimethylaminoazobenzol als Indikator titriert.

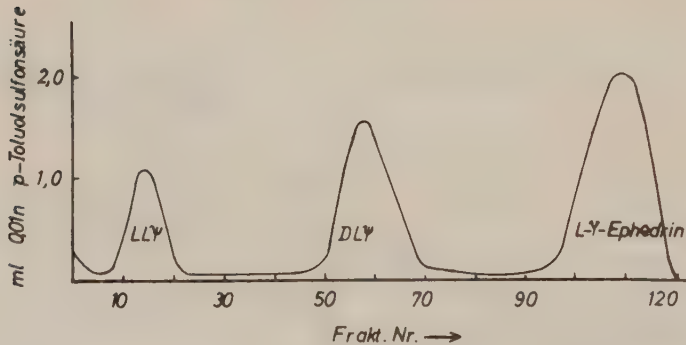


Abb. 40: Analytische Aufteilung des Basengemisches im System Chloroform/Methanol/0,1m Citratpuffer pH 4,5 (10 : 1 : 9 Vol. Tle.), Verfahren: Craig-Grundprozeß mit 120 Verteilungsschritten, $V = 1$, Reaktionsbedingungen wie Standardansatz.

2. Untersuchungen zur Anhydridbildung

Zur Ermittlung der Reaktionsbedingungen für die quantitative Bildung von N-(Dimethylphenylalanyl)-L- ψ -carbäthoxyanhydrid wurde eine Methode entwickelt, die eine quantitative Bestimmung des Anhydrids gestattet. Bei diesem Verfahren wird zur filtrierten THF-Lösung des Anhydrids n HCl gegeben, das Lösungsmittel i. Vak. abgezogen, der Rückstand (N-Dimethylphenylalanin) in 100 ml H₂O aufgenommen und spektralphotometrisch bestimmt.

Das UV-Spektrum des N-Dimethylphenylalanins zeigt im Bereich von 240 - 260 nm deutlich ausgeprägte Absorptionsbanden. Für die Bestimmung wurde das Maximum bei 257 nm herangezogen. Der mittlere molare Extinktionskoeffizient beträgt $\epsilon = 182,5$ [Liter/mol·cm]. Aus den Meßpunkten zur Erstellung einer Eichgeraden errechnet sich eine Standardabweichung $s_{\bar{x}} \pm 0,14$, entsprechend einer durchschnittlichen prozentualen Abweichung von $\pm 1,5\%$.

Bei raschem Arbeiten kann die Bestimmung in ca. 30 Min. durchgeführt werden. Im Filter verbleibt ein Rückstand, bestehend aus Triäthylaminhydrochlorid, einem Komplex aus Triäthylamin und Chlorameisensäureäthylester^{+) und N-Dimethylphenylalanin. Die wäßrige Lösung dieses Rückstandes wurde zu Kontrollzwecken in einer Reihe von Fällen ebenfalls spektralphotometrisch zur Bestimmung der Aminosäure vermessen.}

In einer ersten Versuchsserie wurde zunächst die Reproduzierbarkeit der Anhydridherstellung nach dem Standardverfahren geprüft. Es wurden hierzu jeweils äquivalente Substanzmengen an N-Dimethylphenylalanin, Chlorameisensäureäthylester und Triäthylamin eingesetzt. Die Aktivierungszeit betrug 2 Std., Temp. -15°C . Die weiteren Daten entsprachen dem auf S. 87 angegebenen Standardansatz.

^{+) In der filtrierten Anhydridlösung läßt sich praktisch kein Chlorid nachweisen. Dies ist ein Hinweis, daß Chlorameisensäureäthylester als Komplex im Filterrückstand ungelöst vorliegt. Zur Wechselwirkung von Chlorkohlensäureester und tertiären Basen vgl. (89, 90).}

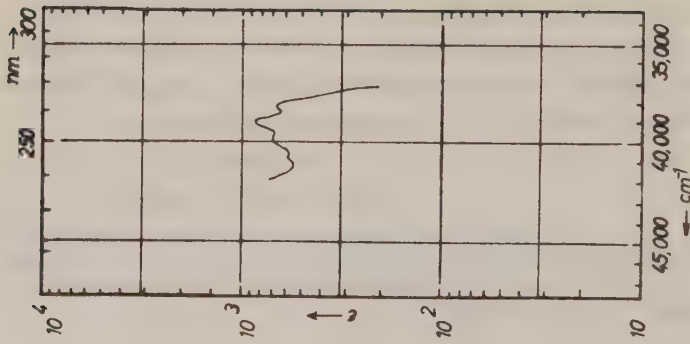


Abb. 41: Absorptionsspektrum von N-D, L-Dimethylphenylalanin in Wasser-HCl.

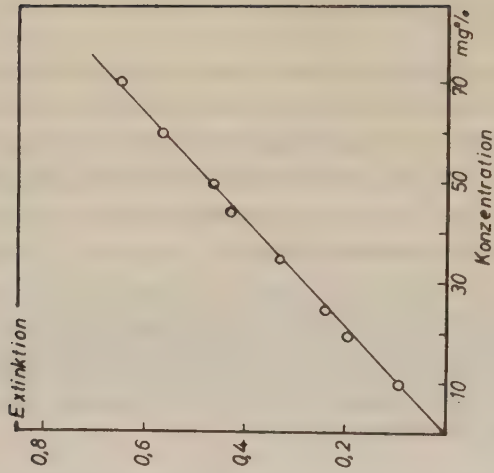


Abb. 42: Eichkurve von N-D, L-Dimethylphenylalanin in Abhängigkeit von der Konzentration.

Tabelle 8 zeigt das Ergebnis von 7 Versuchen, die mit $V_1 - V_7$ bezeichnet sind. Der Mittelwert der Ausbeute an N-Dimethylphenylalanin aus hydrolysiertem Anhydrid beträgt 75,5 %. Der Rest wird als nicht umgesetzte Aminosäure im Filtrerrückstand wiedergefunden. Die Standardabweichung vom Mittelwert berechnet sich zu $\pm 4,4$ %.

Tabelle 8: Anhydridausbeute in Prozent eingesetzter Aminosäure beim Standardversuch

Versuch	V_1	V_2	V_3	V_4	V_5	V_6	V_7	Mittelwert
Aminosäure im Anhydrid	77,8	75,6	79,3	70,5	68,4	79,3	78,2	75,5
Aminosäure im Filtrerrückstand	22,0	24,4	20,0	29,5	30,8	19,0	21,8	23,9
Summe	99,8	100,0	99,3	100,0	99,2	98,3	100,0	99,4

Eine mögliche Erklärung für die unvollständige Bildung des Anhydrids ist die Unlöslichkeit von N-Dimethylphenylalanin in THF.

Es wurde versucht, die Ausbeute durch längere Rührzeiten zu verbessern. Die Ergebnisse in Abb. 43 zeigen, daß selbst durch 15 stündiges Rühren keine Steigerung der Anhydridmenge zu erreichen ist. Die im Standardversuch gewählte Reaktionszeit (4 Std.) ist für eine optimale Ausbeute bereits ausreichend.

Durch Änderung des Konzentrationsverhältnisses N-Dimethylphenylalanin/Triäthylamin/Chlorameisensäureäthylester/L- Ψ -Ephedrin (1 : 2 : 2 : 1) in einem Standardversuch ließ sich eine Verbesserung der Anhydridausbeute erreichen. Wie die Verteilungskurve in Abb. 44 zeigt, erweist sich jedoch diese Synthesemodifikation als wenig geeignet, da bei der Aminolyse mit L- Ψ -Ephedrin eine Anzahl von Nebenprodukten gebildet wird.

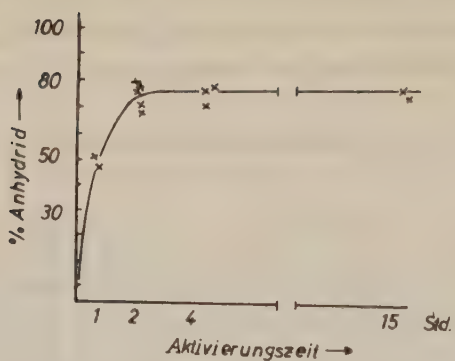


Abb. 43: Abhängigkeit der Anhydridbildung von der Aktivierungszeit. Reaktionsbedingungen wie Standardansatz S. 87

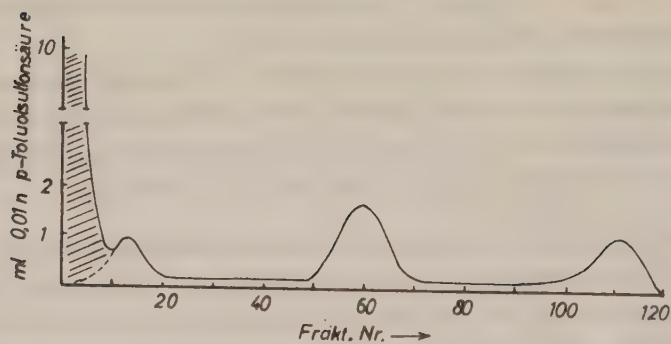
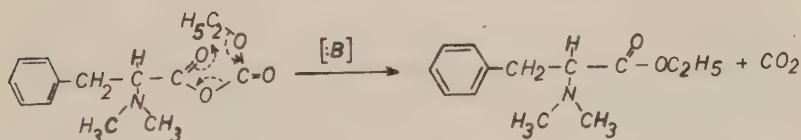


Abb. 44: Verteilungskurve des Syntheserohprodukts, Molverhältnis N-Dimethylphenylalanin/Triäthylamin/Chlorameisensäureäthylester/L- Ψ -Ephedrin 1 : 2 : 2 : 1, Lösungsmittelsystem wie Abb. 40

In den Elementen 0-5 wurde ein dünnflüssiges Öl gefunden, das selbst bei Erhöhung der Schrittzahl ($n = 150$) nicht von LL Ψ abzutrennen war. Diese Trennung gelang jedoch dünnschichtchromatographisch; das Öl bestand vorwiegend aus N-Dimethylphenylalaninäthylester. Es wurde durch Vergleich mit einer synthetisierten Bezugssubstanz identifiziert.

Eine solche Zersetzung von Aminosäuremischanhydriden wurde auch von TARBE LL (91) beobachtet und dafür folgender Reaktionsmechanismus angegeben:



Diese Zersetzung wird durch Triäthylamin und höhere Temperatur begünstigt. Der Base wird dabei die Rolle eines Katalysators zugeschrieben.

3. Untersuchungen zur Aminolyse

In den folgenden Versuchen wurde die optimale Reaktionszeit für die Bildung der Diastereomeren N-(N-Dimethylphenylalanyl)-L- Ψ -ephedrine ermittelt. Das zur Aminolyse eingesetzte L- Ψ -Ephedrin bezogen wir auf die jeweils gefundene Menge Anhydrid; es wurden äquimolare Mengen beider Komponenten verwendet. Nach Zugabe von L- Ψ -Ephedrin wurde zu verschiedenen Reaktionszeiten ein gemessener Anteil entnommen und die Aminolyse durch Zusatz eines Überschusses von n HCl unterbrochen. Die Aufarbeitung und analytische Bestimmung erfolgte nach dem auf S.89 beschriebenen Verfahren. Aus Abb. 45 geht hervor, daß nach einer Dauer von ca. 2 Std. die Aminolyse beendet ist. Die Umsetzung desamins mit dem gemischten Anhydrid setzt momentan ein. Wir beobachteten bei Zugabe der gekühlten L- Ψ -Ephedrin-Lösung zum Anhydrid nach wenigen Sekunden eine Fällung von N-Dimethylphenylalanin, infolge Angriff desamins am "falschen" Carbonyl-C-Atom ("Urethan"-Bildung, vgl. Formelschema S. 88).

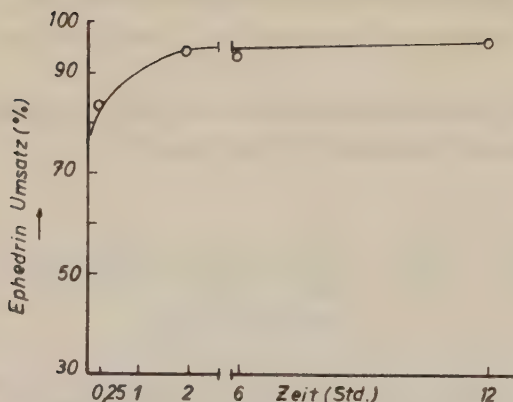


Abb. 45: Einfluß der Aminolysedauer auf den L- ψ -Ephedrin-Umsatz, Reaktionsbedingungen wie Standardansatz S. 87

Durch die Untersuchung der einzelnen Schritte bei der Synthese von N-(D, L-N-Dimethylphenylalanyl)-L- ψ -ephedrin ließen sich Bedingungen ermitteln, die eine nahezu quantitative Umsetzung von L- ψ -Ephedrin ermöglichen. Die in früheren Versuchen mit unfiltrierten Anhydrid-Ansätzen erzielten niedrigen L- ψ -Ephedrin-Umsatzraten lassen sich wie folgt erklären:

Bei Bildung des Anhydrids wird HCl frei. Zwischen den entstehenden Salzen Triäthylamin- und L- ψ -Ephedrinhydrochlorid stellt sich aufgrund der ähnlichen Basenstärke (pK_a Triäthylamin = 10,45, pK_a L- ψ -Ephedrin = 9,84) ein Gleichgewicht ein. Ein Teil des L- ψ -Ephedrins liegt nun protoniert vor und reagiert nicht mehr mit dem gemischten Anhydrid. Dies führt zu einer geringeren Ausbeute an N-(Aminoacyl)-ephedrin und Urethan. Eine experimentelle Stütze für diesen Befund liefert die Umsetzung von Phenolalkanolaminen (88), deren pK_a ca. eine pK_a -Einheit niedriger liegt (z. B. Phenylephrin pK_a = 8,92, Norfenefrin pK_a = 8,67). Diese Basen betätigen sich praktisch nicht als HCl-Acceptoren und aminolysieren das gemischte Anhydrid vollständig.

Diese Störung wird durch Filtrieren des Anhydrids (Abtrennen von Triäthylaminhydrochlorid) beseitigt. Wie aus Tabelle 9 zu entnehmen ist, ließ sich durch diese Modifikation des Versuchs und durch den aufgrund der analytischen Bestimmung möglichen exakten Einsatz äquimolarer Mengen Anhydrid und L- Ψ -Ephedrin der Ephedrinumsatz von 63 % auf 95 % steigern.

Tabelle 9: Prozentuale Ausbeute der Reaktionskomponenten im modifizierten (A_1 , A_2) und im nicht filtrierte Standardversuch (A_3)

Versuch	Diastereomeren- gemisch	N-(Carbäthoxy)- L- Ψ -ephedrin	Gesamtumsatz an L- Ψ -Ephedrin	freies L- Ψ -Ephedrin
A_1	21,6	73,2	94,8	3,8
A_2	22,8	71,0	93,8	3,2
A_3	15,0	48,0	63,0	37,0

II. Versuche zur stereoselektiven Aminolyse

Bei der Reaktion eines racemischen Carbonsäureanhydrids mit einem chiralen Amin entstehen diastereomere Amide (A und B). Die Geschwindigkeitskonstanten für ihre Bildung sind verschieden ($k_A \neq k_B$), da die Übergangszustände, die aus der Wechselbeziehung der enantiomeren Anhydride mit der chiralen Base resultieren, eine unterschiedliche freie Energie aufweisen. Für den Reaktionsverlauf einer solchen Umsetzung ergibt sich folgendes:

Mit Ausnahme vom Reaktionsende darf zu keinem Zeitpunkt der Umsetzung das Konzentrationsverhältnis der diastereomeren Amide den Wert 1 erreichen. Es nimmt vom Beginn der Reaktion an laufend zu, um nach dem Auftreten eines Maximalwertes zum Ende der Umsetzung das Diastereomerenverhältnis 1 : 1 einzustellen.

Im Falle der Umsetzung von N-D,L-Dimethylphenylalanin mit L- Ψ -Ephedrin wurde jedoch im Gegensatz dazu nach Beendigung der Reaktion ein Diastereomerenverhältnis (DL Ψ : LL Ψ) 2 : 1 beobachtet (vgl. Tabelle 10). Eine Erklärung hierfür bietet die konkurrierende Reaktion von L- Ψ -Ephedrin mit der CO-Gruppe des Kohlensäureanteils. Diese unerwünschte Reaktion am falschen Carbonyl-C-Atom ist stark bevor-

zugt. Um diese Verhältnisse näher zu untersuchen, wurde die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches (DL Ψ , LL Ψ , Urethan und L- Ψ -Ephedrin) nach verschiedenen Umsetzungszeiten bestimmt.

1. Umsetzung von racemischem Anhydrid mit L- Ψ -Ephedrin

In dieser Versuchsserie wurden die bei -15°C und -30°C gehaltenen Reaktionsansätze nach 5, 15, 120, 360 und 720 Min. aufgearbeitet und die Zusammensetzung ermittelt. Überraschenderweise konnten wir keine Veränderung des Diastereomerenverhältnisses DL Ψ : LL Ψ feststellen. Es betrug zu allen Reaktionszeiten etwa 2 : 1. Selbst bei einer sehr langen Versuchsdauer (12 Std.) wurde das Verhältnis 1 : 1 nicht eingestellt. Auch eine Erhöhung der Temperatur auf $+18^{\circ}\text{C}$ brachte keine Veränderung, ebenso die Erhöhung der L- Ψ -Ephedrin-Menge auf das 5- bzw. 10-fache.

Tabelle 10: Einfluß der Aminolysedauer auf das Diastereomerenverhältnis DLΨ: LLΨ

Dauer der Aminolyse [Min.]	Temp.	% Ausbeute			Gesamt- umsatz [%]	Diastereomeren- Quotient DLΨ : LLΨ
		Amid	N-(Carbäth- oxy)L-Ψ-ephedrin	L-Ψ-Ephedrin		
1	-30°	DL Ψ 2,14	45,4	49,3	48,5	2,14 : 1
		LL Ψ 1,00				
5	-30°	DL Ψ 6,40	62,4	25,4	72,0	1,95 : 1
		LL Ψ 3,28				
	-15° +)					1,95 : 1
15	-15°	DL Ψ 11,70	66,1	13,8	83,6	1,90 : 1
		LL Ψ 6,15				
120	-15° +)					1,90 : 1
360	+18° ++)	DL Ψ 14,00	73,2	3,8	94,8	1,84 : 1
		LL Ψ 7,60				
720	+18° ++)	DL Ψ 13,80	72,2	4,0	93,5	1,84 : 1
		LL Ψ 7,50				
	-15° +)					2,10 : 1
720	+18° ++)	DL Ψ 14,20	73,0	3,9	96,1	2,06 : 1
		LL Ψ 6,90				

+) Es wurde nur das Diastereomerenverhältnis geprüft

++) Versuchsbedingungen nach modifiziertem Standardansatz

2. Umsetzung von optisch aktivem Anhydrid mit L- ψ -Ephedrin

In zwei weiteren Versuchsserien wurden die optisch aktiven Anhydride mit L- ψ -Ephedrin in äquimolaren Mengen bei -30°C zur Reaktion gebracht und die gebildeten Mengen DL ψ bzw. LL ψ und Urethan nach 1, 3, 5, 15 und 30 Min. bestimmt.

Die Versuchsergebnisse zeigen eine deutlich größere Bildungsgeschwindigkeit für DL ψ (Abb. 46). Die Urethanbildung war dagegen bei der Aminolyse von D-Anhydrid verringert (Abb. 47). Der Kurvenverlauf für die L- ψ -Ephedrin-Abnahme ist für die Umsetzung mit D- und L-Anhydrid sehr ähnlich (Abb. 48).

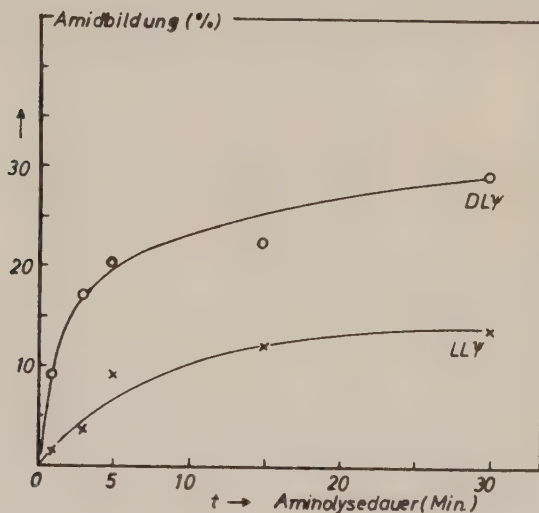


Abb. 46: Bildung der beiden Diastereomeren DL ψ und LL ψ in Abhängigkeit von der Aminolysedauer bei -30°C

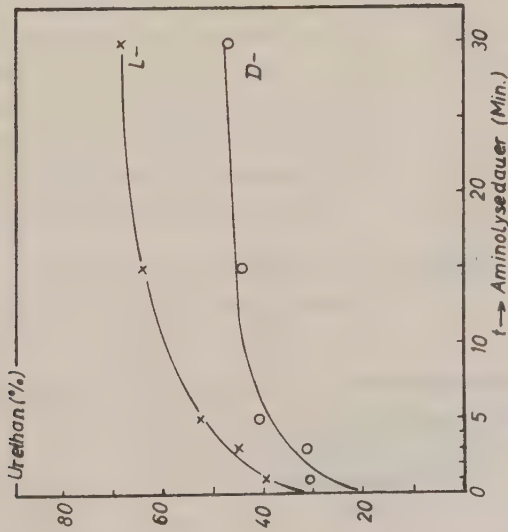


Abb. 47: Bildung von N-(Carbäthoxy)-L-ψ-ephedrin in Abhängigkeit von der Aminolysedauer bei -30°C

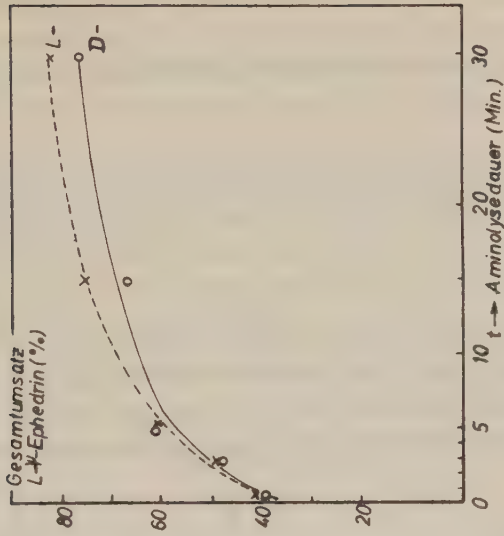


Abb. 48: Prozentuale Umsatzrate von L-ψ-Ephedrin bei der Umwandlung des chiralen gemischten Anhydrids zu den Diastereomeren DLψ und LIψ und N-(Carbäthoxy)-L-ψ-ephedrin

Die Aminolyseversuche mit optisch aktiven Anhydriden und L- ψ -Ephedrin zeigen deutlich den stereoselektiven Verlauf der Reaktion. Die Geschwindigkeit der L- ψ -Ephedrin-Abnahme ist zwar bei der Umsetzung mit den enantiomeren Anhydriden ähnlich, jedoch unterscheiden sich die Bildungsgeschwindigkeiten für DL ψ und LL ψ erheblich.

Diese verschiedenen Geschwindigkeiten haben ihre Ursache in diastereomeren Übergangszuständen, die sich in ihrer freien Energie und damit in ihrer Stabilität unterscheiden. Die ähnlichen Geschwindigkeiten der L- ψ -Ephedrin-Abnahme erklären sich wahrscheinlich dadurch, daß die Summen der Bildungsgeschwindigkeit

$k_{\text{N-(Aminoacyl)-ephedrin}}$ und k_{Urethan} für beide Umsetzungen etwa gleich sind.

In einem gewissen Gegensatz dazu steht allerdings die Beobachtung, daß bei der Umsetzung der optisch aktiven Anhydride nach kurzen Reaktionszeiten ein vom Verhältnis 2 : 1 abweichender Diastereomeren-Quotient festgestellt werden kann (Abb. 49).

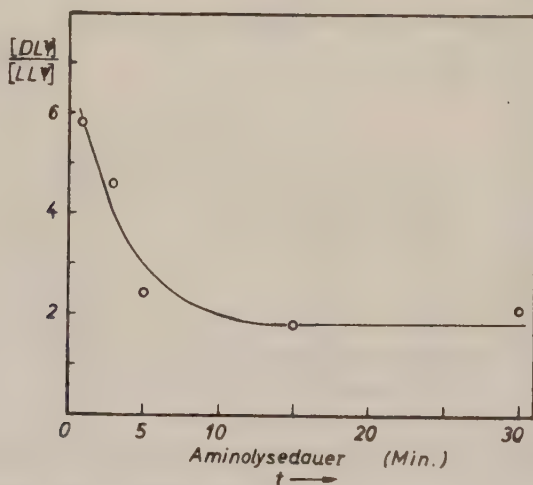


Abb. 49: Abnahme des Diastereomerenverhältnisses DL ψ : LL ψ in Abhängigkeit von der Aminolysedauer

F. Experimenteller Teil

1. Bestimmung der Geschwindigkeit der Erregungsleitung im Herzmuskel des Frosches

Die Leitungsgeschwindigkeit (LG) der Erregung wurde am elektrisch gereizten Ventrikelstreifen des Froschherzens in Anlehnung an die Angaben von BAMMER u. ROTHSCUH (47) gemessen.

1. Präparat

Vom isolierten Froschherzen (*Rana esculenta*, Männchen) wurde aus der Herzkammer in spiraliger Schnittführung ein etwa 1-2mm breiter und 4-6 cm langer Streifen hergestellt. Nach Entfernung des reizbildenden Gewebes und überflüssiger Anteile der spongösen Muskelbälkchen zeigten die Streifen im allgemeinen keine Spontan-tätigkeit mehr.

2. Anordnung und Apparatur

Der Streifen wird auf ein Platinreizelektrodenpaar und zwei Platinableitungselektrodenpaare aufgespannt (Abstand 2 cm). Dabei ist zu vermeiden, daß das Präparat beim Einspannen durch Druck oder Zug geschädigt wird. Die Erregungswelle wurde durch einen elektrischen Reiz von einem Ende des Präparates aus mit einem GRASS-Stimulator ausgelöst. Als Reize dienten Rechteckimpulse (0,5 Hz) von 2 mSek. Dauer und konstanter, doppelt überschwelliger Stärke. Die Aufzeichnung der Aktionsströme erfolgte über die beiden Ableitelektrodenpaare und zwei getrennte EEG-Verstärker- und Registriersysteme (Cardioscript, S. F. SCHWARZER, München).

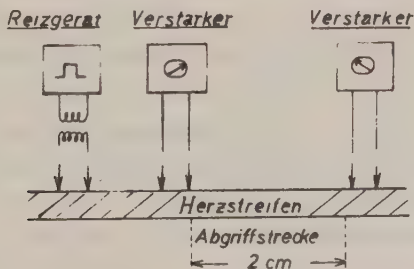


Abb. 50: Abgriff mit zwei unabhängigen Registriersystemen und Elektrodenpaaren

3. Auswertung

Die Bestimmung der LG erfolgte aus der zeitlichen Verzögerung zweier Aktionsströme, die längs des Streifens von zwei Ableitelektroden in einem Abstand von 2 cm abgegriffen wurden. Dabei erhielt man biphasische Aktionsströme, deren Spitzenabstände (R-Zacke) der Zeitmessung zugrundelag.

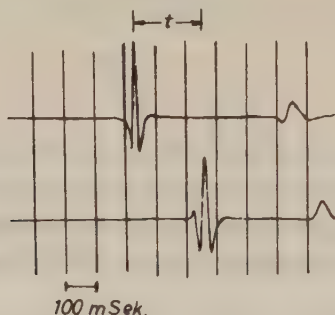


Abb. 51: Prinzip der Kurvenauswertung.

Die Leitungsgeschwindigkeit LG errechnet sich aus der Zeitversetzung R_1 und R_2 (t) und der Länge der Abgriffstrecke (2 cm).
Bei Hemmung der Erregungsleitung vergrößert sich t.

4. Versuchsgang

Der Herzmuskelstreifen wurde bis zum Versuchsbeginn in eine mit der Badlösung gefüllte und mit Sauerstoff durchperlte Wanne gebracht. Im Verlauf von etwa einer Stunde hatte sich der Streifen vom Eingriff der Präparation erholt und dem entsprechenden pH-Wert angepaßt. Nach dieser Vorbehandlung wurde das Präparat eingespannt. Sobald sich eine konstante Ausgangsleitungsgeschwindigkeit eingestellt hatte, wurde in das Bad (Vol. = 50 ml) 0,1 - 0,5 ml der Testlösung pipettiert. Die Registrierung der LG erfolgte alle 3 Min., die Versuchsdauer betrug 30 Min. In Abänderung der Methode von BAMMER u. ROTHSCUH (47) blieb der ganze Streifen samt Reiz- und Ableitelektroden während des Meßvorganges bei Zimmertemperatur im Badgefäß eingetaucht. Die Badlösung wurde während der Versuchsdauer mit Sauerstoff versorgt.

Tab. II: Prozentuale Hemmung der Erregungsleitungsgeschwindigkeit LG (cm/sec) unter der
Einwirkung stereoisomerer N-(N-Dimethylphenylalanyl)-ephedrine bei pH 7,3. Als
Streuungswerte sind die mittleren Fehler (f) der Mittelwerte ($\bar{x}$) angegeben (n = 8-12).

Einw.-Zeit (Min.)	Verbindung 1a				Einw.-Zeit (Min.)	Verbindung 1b			
	50 μ Mol/l	74 μ Mol/l	100 μ Mol/l	145 μ Mol/l		50 μ Mol/l	60 μ Mol/l	80 μ Mol/l	100 μ Mol/l
6	14,0 $\pm$ 2,7	16,5 $\pm$ 4,5	16,1 $\pm$ 1,2	25,1 $\pm$ 2,9	6	20,5 $\pm$ 1,3	19,7 $\pm$ 1,2	25,7 $\pm$ 2,8	33,2 $\pm$ 0,9
12	19,0 $\pm$ 3,2	23,2 $\pm$ 1,8	26,1 $\pm$ 2,2	35,6 $\pm$ 3,4	12	29,9 $\pm$ 1,6	30,6 $\pm$ 0,9	37,1 $\pm$ 2,0	46,1 $\pm$ 1,1
18	21,0 $\pm$ 3,2	28,1 $\pm$ 1,8	33,5 $\pm$ 2,1	41,6 $\pm$ 3,4	18	35,6 $\pm$ 1,9	38,1 $\pm$ 0,9	45,1 $\pm$ 1,9	52,5 $\pm$ 1,1
24	23,5 $\pm$ 3,2	31,4 $\pm$ 1,9	38,0 $\pm$ 2,4	47,6 $\pm$ 2,3	24	38,8 $\pm$ 2,1	43,1 $\pm$ 1,6	50,1 $\pm$ 1,5	57,1 $\pm$ 1,1
30	24,0 $\pm$ 3,7	33,1 $\pm$ 2,0	41,0 $\pm$ 2,4	51,1 $\pm$ 3,0	30	40,0 $\pm$ 2,2	45,1 $\pm$ 1,3	53,1 $\pm$ 1,3	59,1 $\pm$ 1,5

Einw.-Zeit (Min.)	Verbindung 2a		Verbindung 2b		Einw.-Zeit (Min.)	Verbindung 3a		Verbindung 3b	
	31 μ Mol/l	40 μ Mol/l	22 μ Mol/l	40 μ Mol/l		37 μ Mol/l	100 μ Mol/l	35 μ Mol/l	56 μ Mol/l
6	28,1 $\pm$ 0,8	30,2 $\pm$ 1,1	12,9 $\pm$ 1,4	15,7 $\pm$ 1,0	6	10,6 $\pm$ 1,2	22,5 $\pm$ 2,3	12,7 $\pm$ 0,9	18,1 $\pm$ 1,5
12	37,1 $\pm$ 1,8	38,7 $\pm$ 1,3	19,4 $\pm$ 1,6	23,2 $\pm$ 0,9	12	15,6 $\pm$ 1,5	32,7 $\pm$ 2,5	20,8 $\pm$ 1,5	26,6 $\pm$ 2,1
18	42,2 $\pm$ 1,6	44,7 $\pm$ 1,0	22,9 $\pm$ 1,2	29,1 $\pm$ 1,8	18	20,2 $\pm$ 1,5	40,1 $\pm$ 2,8	26,0 $\pm$ 1,2	32,6 $\pm$ 2,3
24	45,6 $\pm$ 1,9	49,1 $\pm$ 2,5	24,3 $\pm$ 1,3	34,3 $\pm$ 2,5	24	23,6 $\pm$ 1,9	46,1 $\pm$ 3,0	29,6 $\pm$ 1,6	37,6 $\pm$ 2,9
30	47,1 $\pm$ 2,5	53,6 $\pm$ 3,0	24,8 $\pm$ 1,9	38,6 $\pm$ 2,0	30	26,2 $\pm$ 2,5	51,1 $\pm$ 3,1	32,2 $\pm$ 1,7	41,6 $\pm$ 3,5

Fortsetzung: Tab. 11

Einw.-Zeit (Min.)	Verbindung 4a			Verbindung 4b	
	74 μ Mol/l	80 μ Mol/l	300 μ Mol/l	64 μ Mol/l	80 μ Mol/l
6	11,1 $\pm$ 2,0	11,3 $\pm$ 1,3	32,2 $\pm$ 2,1	19,1 $\pm$ 1,2	19,7 $\pm$ 1,3
12	17,2 $\pm$ 2,5	17,4 $\pm$ 1,2	44,6 $\pm$ 2,8	27,1 $\pm$ 1,3	29,1 $\pm$ 1,2
18	21,1 $\pm$ 2,8	22,3 $\pm$ 1,5	52,6 $\pm$ 2,9	32,1 $\pm$ 1,5	35,5 $\pm$ 1,8
24	23,7 $\pm$ 3,1	25,1 $\pm$ 1,1	57,1 $\pm$ 3,1	36,1 $\pm$ 1,5	40,1 $\pm$ 2,5
30	25,1 $\pm$ 3,5	26,0 $\pm$ 2,5	60,6 $\pm$ 3,8	37,6 $\pm$ 1,4	43,5 $\pm$ 2,0

Tab.12: Prozentuale Hemmung der Erregungsleitungsgeschwindigkeit LG (cm/sec) unter der Einwirkung von N-(D-N-Dimethylalanyl)-2,6-dimethylanilin (1a) und N-(L-N-Dimethylalanyl)-2,6-dimethylanilin (1b) bei pH 7,03. Als Streuwerte sind die mittleren Fehler (f) der Mittelwerte ($\bar{x}$) angegeben (n=10-12)

Einw.-Zeit (Min.)	Verbindung 1a		Verbindung 1b		
	41,4 μ Mol/l	92,0 μ Mol/l	41,4 μ Mol/l	92,0 μ Mol/l	150,0 μ Mol/l
6	29,7 $\pm$ 1,1	30,2 $\pm$ 1,9	15,5 $\pm$ 1,2	20,7 $\pm$ 1,6	25,2 $\pm$ 1,4
12	35,7 $\pm$ 1,2	38,2 $\pm$ 1,5	21,6 $\pm$ 1,1	28,2 $\pm$ 2,2	33,1 $\pm$ 1,9
18	39,2 $\pm$ 2,2	43,7 $\pm$ 2,8	25,1 $\pm$ 1,1	32,7 $\pm$ 1,2	37,7 $\pm$ 1,6
24	40,6 $\pm$ 3,0	47,6 $\pm$ 3,7	21,1 $\pm$ 1,6	35,7 $\pm$ 1,6	41,2 $\pm$ 2,0
30	41,2 $\pm$ 3,3	51,1 $\pm$ 4,6	27,8 $\pm$ 3,1	37,1 $\pm$ 3,3	43,2 $\pm$ 2,8

Tab. 13: Prozentuale Hemmung der Erregungsleitungsgeschwindigkeit LG (cm/sec) unter der Einwirkung von N-(D-N-Dimethylphenylalanyl)-2,6-dimethylanilin (2a) und N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-2,6-dimethylanilin (2b) bei pH 6,49. Als Streuwerte sind die mittleren Fehler (f) der Mittelwerte ($\bar{x}$) angegeben (n = 8-10).

Einw.-Zeit (Min.)	Verbindung 2a			Verbindung 2b	
	8,0 μ Mol/l	19,0 μ Mol/l	28,0 μ Mol/l	8,0 μ Mol/l	24,0 μ Mol/l
6	10,1 $\pm$ 1,2	17,7 $\pm$ 1,8	22,9 $\pm$ 2,0	15,1 $\pm$ 1,1	16,0 $\pm$ 1,2
12	16,1 $\pm$ 2,0	25,8 $\pm$ 2,4	31,5 $\pm$ 2,6	23,7 $\pm$ 1,9	26,1 $\pm$ 0,9
18	20,6 $\pm$ 1,6	31,2 $\pm$ 2,4	36,3 $\pm$ 2,6	29,6 $\pm$ 1,7	34,3 $\pm$ 1,4
24	23,6 $\pm$ 1,7	34,2 $\pm$ 2,7	39,5 $\pm$ 2,8	33,6 $\pm$ 2,4	41,1 $\pm$ 1,7
30	26,6 $\pm$ 2,4	36,6 $\pm$ 1,4	41,4 $\pm$ 3,4	36,6 $\pm$ 3,2	47,2 $\pm$ 1,9

Tab. 14: Prozentuale Hemmung der Erregungsleitungsgeschwindigkeit LG (cm/sec) unter der Einwirkung stereoisomerer N-(N-Dimethylphenylalanyl)-ephedrine bei verschiedenen pH-Werten. Als Streuungswerte sind die mittleren Fehler ($\bar{x}$) angegeben ($n = 8 - 12$).

Einw. - Zeit (Min.)	Verbindung 1a (Konz. 50 μ Mol/l)				Einw. - Zeit (Min.)	Verbindung 1b (Konz. 50 μ Mol/l)			
	pH 6, 2	pH 6, 8	pH 7, 9	pH 8, 3		pH 6, 2	pH 6, 8	pH 7, 9	pH 8, 3
6	10, 4 $\pm$ 1, 1	10, 3 $\pm$ 0, 9	14, 4 $\pm$ 1, 8	13, 6 $\pm$ 0, 8	6	18, 5 $\pm$ 0, 5	17, 8 $\pm$ 1, 2	26, 8 $\pm$ 0, 9	29, 1 $\pm$ 1, 4
12	17, 4 $\pm$ 1, 6	15, 3 $\pm$ 2, 0	26, 3 $\pm$ 3, 3	22, 5 $\pm$ 0, 9	12	28, 0 $\pm$ 0, 9	26, 6 $\pm$ 1, 6	39, 8 $\pm$ 0, 9	44, 2 $\pm$ 2, 1
18	22, 3 $\pm$ 2, 0	18, 2 $\pm$ 2, 6	27, 5 $\pm$ 2, 7	29, 6 $\pm$ 1, 5	18	34, 9 $\pm$ 1, 2	32, 5 $\pm$ 1, 9	49, 0 $\pm$ 1, 0	56, 2 $\pm$ 2, 8
24	26, 0 $\pm$ 2, 4	20, 1 $\pm$ 2, 9	31, 2 $\pm$ 2, 7	35, 3 $\pm$ 2, 3	24	40, 5 $\pm$ 1, 5	36, 9 $\pm$ 2, 3	56, 0 $\pm$ 1, 4	66, 4 $\pm$ 3, 7
30	29, 0 $\pm$ 1, 0	22, 8 $\pm$ 1, 5	33, 6 $\pm$ 2, 6	40, 3 $\pm$ 3, 1	30	45, 0 $\pm$ 2, 0	41, 5 $\pm$ 2, 5	61, 0 $\pm$ 2, 0	71, 0 $\pm$ 1, 6

Einw. - Zeit (Min.)	Verbindung 2a (Konz. 40 μ Mol/l)				Einw. - Zeit (Min.)	Verbindung 2b (Konz. 40 μ Mol/l)			
	pH 6, 2	pH 6, 8	pH 8, 0	pH 8, 3		pH 6, 2	pH 6, 8	pH 8, 0	pH 8, 3
6	18, 0 $\pm$ 1, 5	23, 0 $\pm$ 1, 1	27, 3 $\pm$ 3, 2	29, 5 $\pm$ 0, 9	6	10, 9 $\pm$ 1, 9	12, 3 $\pm$ 0, 8	17, 5 $\pm$ 0, 9	17, 6 $\pm$ 0, 7
12	26, 5 $\pm$ 1, 9	23, 7 $\pm$ 1, 8	40, 9 $\pm$ 3, 3	44, 2 $\pm$ 1, 8	12	16, 1 $\pm$ 2, 5	20, 5 $\pm$ 1, 1	28, 5 $\pm$ 1, 3	29, 6 $\pm$ 1, 6
18	32, 1 $\pm$ 2, 2	39, 1 $\pm$ 2, 3	51, 1 $\pm$ 2, 9	55, 2 $\pm$ 2, 1	18	19, 1 $\pm$ 2, 5	26, 2 $\pm$ 1, 4	35, 3 $\pm$ 1, 4	36, 4 $\pm$ 2, 1
24	36, 4 $\pm$ 2, 5	43, 5 $\pm$ 2, 5	59, 7 $\pm$ 2, 5	65, 5 $\pm$ 1, 9	24	20, 3 $\pm$ 3, 8	27, 9 $\pm$ 1, 7	40, 3 $\pm$ 1, 3	41, 5 $\pm$ 1, 8
30	42, 0 $\pm$ 3, 0	48, 0 $\pm$ 2, 5	67, 0 $\pm$ 2, 1	70, 0 $\pm$ 1, 5	30	20, 5 $\pm$ 4, 9	28, 5 $\pm$ 2, 8	44, 1 $\pm$ 1, 7	45, 0 $\pm$ 2, 0

Forts. Tab. 14:

Einw.- Zeit (Min.)	Verbindung 3a (Konz. 40 μ Mol/l)				Einw.- Zeit (Min.)	Verbindung 3b (Konz. 40 μ Mol/l)			
	pH 6,2	pH 6,5	pH 7,9	pH 8,3		pH 6,2	pH 6,5	pH 7,9	pH 8,3
6	10,5 $\pm$ 2,0	11,5 $\pm$ 0,9	12,5 $\pm$ 1,3	13,3 $\pm$ 0,7	6	9,5 $\pm$ 0,5	9,9 $\pm$ 1,5	16,1 $\pm$ 1,1	16,7 $\pm$ 1,3
12	15,8 $\pm$ 1,6	16,8 $\pm$ 0,6	20,2 $\pm$ 1,6	21,3 $\pm$ 0,9	12	16,3 $\pm$ 1,6	15,5 $\pm$ 1,9	26,3 $\pm$ 0,9	27,1 $\pm$ 1,7
18	19,3 $\pm$ 2,2	19,4 $\pm$ 0,5	25,3 $\pm$ 1,5	27,1 $\pm$ 0,8	18	19,2 $\pm$ 1,0	19,6 $\pm$ 1,9	34,0 $\pm$ 1,7	34,6 $\pm$ 2,1
24	21,4 $\pm$ 2,1	21,6 $\pm$ 0,4	28,9 $\pm$ 1,7	31,5 $\pm$ 0,9	24	21,7 $\pm$ 1,1	22,3 $\pm$ 1,8	38,1 $\pm$ 2,1	41,0 $\pm$ 2,6
30	22,5 $\pm$ 1,5	23,5 $\pm$ 0,3	31,5 $\pm$ 1,5	34,9 $\pm$ 0,8	30	23,5 $\pm$ 1,1	24,2 $\pm$ 1,7	41,0 $\pm$ 2,5	46,5 $\pm$ 2,6

Einw.- Zeit (Min.)	Verbindung 4a (Konz. 80 μ Mol/l)				Einw.- Zeit (Min.)	Verbindung 4b (Konz. 80 μ Mol/l)			
	pH 6,2	pH 7,8	pH 8,3			pH 6,2	pH 7,85	pH 8,3	
6	8,5 $\pm$ 0,5	21,9 $\pm$ 1,3	20,5 $\pm$ 1,0		6	14,5 $\pm$ 1,1	24,2 $\pm$ 0,9	17,5 $\pm$ 1,4	
12	15,0 $\pm$ 0,7	31,0 $\pm$ 1,8	34,0 $\pm$ 1,9		12	22,4 $\pm$ 1,3	36,3 $\pm$ 1,3	34,7 $\pm$ 2,3	
18	19,1 $\pm$ 0,9	37,5 $\pm$ 1,6	41,8 $\pm$ 1,5		18	29,3 $\pm$ 1,0	44,5 $\pm$ 1,1	48,0 $\pm$ 1,1	
24	21,3 $\pm$ 1,1	40,3 $\pm$ 1,3	44,5 $\pm$ 2,0		24	34,1 $\pm$ 2,1	50,9 $\pm$ 1,8	58,1 $\pm$ 2,4	
30	23,5 $\pm$ 1,0	44,0 $\pm$ 1,1	50,5 $\pm$ 2,0		30	38,0 $\pm$ 2,1	56,1 $\pm$ 1,9	65,0 $\pm$ 2,5	

Tab. 15: Prozentuale Hemmung der Erregungsleitungsgeschwindigkeit LG (cm/sec) unter der Einwirkung von N-(D-N-Dimethylalanyl)-2, 6-dimethylanilin (1a) und N-(L-N-Dimethylalanyl)-2, 6-dimethylanilin (1b) bei verschiedenen pH-Werten. Als Streuungswerte sind die mittleren Fehler (f) der Mittelwerte ($\bar{x}$) angegeben (n = 8 - 12).

Einw.-Zeit (Min.)	Verbindung 1a (Konz. 41, 4 μ Mol/l)			
	pH 6, 25	pH 6, 7	pH 7, 35	pH 8, 1
6	23, 6 $\pm$ 2, 4	24, 9 $\pm$ 2, 7	20, 4 $\pm$ 1, 5	13, 1 $\pm$ 1, 1
12	34, 8 $\pm$ 3, 2	32, 8 $\pm$ 2, 9	27, 8 $\pm$ 1, 5	20, 2 $\pm$ 1, 8
18	41, 0 $\pm$ 4, 1	37, 8 $\pm$ 2, 1	32, 2 $\pm$ 1, 6	24, 0 $\pm$ 2, 1
24	44, 1 $\pm$ 3, 9	40, 8 $\pm$ 2, 0	34, 8 $\pm$ 1, 7	26, 1 $\pm$ 2, 4
30	46, 4 $\pm$ 3, 5	42, 9 $\pm$ 2, 0	36, 5 $\pm$ 1, 1	26, 4 $\pm$ 2, 1

Einw.-Zeit (Min.)	Verbindung 1b (Konz. 41, 4 μ Mol/l)			
	pH 6, 25	pH 6, 7	pH 7, 35	pH 7, 65
6	15, 6 $\pm$ 1, 4	16, 7 $\pm$ 0, 9	11, 9 $\pm$ 1, 7	4, 5 $\pm$ 1, 7
12	23, 2 $\pm$ 2, 1	22, 0 $\pm$ 1, 3	16, 6 $\pm$ 2, 3	7, 3 $\pm$ 2, 1
18	29, 8 $\pm$ 1, 9	27, 3 $\pm$ 1, 1	18, 9 $\pm$ 2, 5	9, 0 $\pm$ 2, 6
24	33, 2 $\pm$ 2, 2	29, 9 $\pm$ 1, 2	20, 0 $\pm$ 2, 6	9, 8 $\pm$ 2, 6
30	35, 6 $\pm$ 2, 4	32, 1 $\pm$ 1, 0	20, 2 $\pm$ 2, 7	10, 0 $\pm$ 2, 5

Tab. 16: Prozentuale Hemmung der Erregungsleitungsgeschwindigkeit IG (cm/sec) unter der Einwirkung von N-(D-N-Dimethylphenylalanyl)-2, 6-dimethylanilin (2a) und N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-2, 6-dimethylanilin (2b) bei verschiedenen pH-Werten. Als Streuungswerte sind die mittleren Fehler ($\bar{x}$) der Mittelwerte ($\bar{x}$) angegeben (n = 8 - 12).

Einw.-Zeit (Min.)	Verbindung 2a				
	pH 6, 3	pH 6, 8	pH 7, 05	pH 7, 35	pH 7, 8
6	11,4 ± 0,8	13,0 ± 1,9	16,0 ± 2,1	17,1 ± 1,8	12,5 ± 0,9
12	19,0 ± 0,9	21,5 ± 2,1	24,7 ± 2,3	24,5 ± 1,7	19,5 ± 1,3
18	24,5 ± 1,3	27,5 ± 2,3	30,8 ± 2,1	30,5 ± 2,1	23,8 ± 1,1
24	28,3 ± 1,3	32,1 ± 2,8	34,8 ± 2,8	32,5 ± 2,0	16,0 ± 1,2
30	31,0 ± 1,5	35,5 ± 3,0	37,0 ± 3,0	35,0 ± 2,2	18,1 ± 1,8
					20,0 ± 2,0

Ein.-Zeit (Min.)	Verbindung 2b		
	pH 6, 2	pH 6, 8	pH 7, 25
6	17,4 ± 1,3	17,5 ± 0,9	16,0 ± 1,9
12	27,8 ± 1,8	26,1 ± 0,8	25,4 ± 1,8
18	36,2 ± 1,0	33,5 ± 1,3	32,3 ± 2,5
24	43,6 ± 2,2	39,1 ± 1,9	37,1 ± 2,4
30	50,0 ± 1,1	42,6 ± 2,5	41,5 ± 3,0
			48,0 ± 2,1

5. Lösungen

Verwendete Froschringerlösung:

6,0 g	NaCl
0,2 g	KCl
0,12 g	CaCl ₂
0,1 g	NaHCO ₃
0,2 g	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O
1,0 g	Glucose
Aqua dest. ad 1 l	

Die Lösung wurde mit Sauerstoff gesättigt und ihr pH-Wert mit 0,1 n HCl eingestellt. Für Untersuchungen im pH-Bereich über 7,8 wurde Na₂HPO₄ durch 0,3 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan ersetzt und die Lösung durch Titration mit 0,1 n HCl auf den gewünschten pH gebracht.

6. Hemmung der Erregungsleitung im Herzmuskel in Abhängigkeit von der Hemmstoffkonzentration (ID₅₀)

Um die Hemmwirkung (Herabsetzung der LG) der einzelnen Verbindungen vergleichen zu können, wurde die Hemmstoffkonzentration ermittelt, welche nach 30 Min. Einwirkungszeit eine 50-proz. Hemmung der LG bewirkte (Inhibitorische ID₅₀). Trägt man in ein Koordinatensystem (Wahrscheinlichkeitsnetz) die Wirkungsprozentwerte als Ordinate und den log. der Konzentration als Abszisse ein, so ordnen sich die gefundenen Werte auf einer Geraden an. Deshalb kann für den untersuchten Konzentrationsbereich das Vorliegen einer lognormalen Verteilung angenommen werden. Aus der graphischen Darstellung wurde die inhibitorische Dosis ID₅₀ durch Extrapolieren auf den Wert 50 % bestimmt.

7. Untersuchungen am Ranvierschen Schnürring

Die Versuche am Ranvierschen Schnürring wurden im Institut für Biologie (Leiter: Prof. Dr. O. Hug) der Gesellschaft für Strahlenforschung mbH. München, Neuherberg unter Leitung von Herrn Priv. Doz. Dr. H. Müller-Mohnssen durchgeführt, für dessen sehr entgegenkommende und hilfreiche Unterstützung wir an dieser Stelle

bestens danken. Die Methode ist eingehend beschrieben (68).

8. Testsubstanzen

Sämtliche Homologe der 2-Alkoxy-chinolin-4-carbonsäure-diäthylamino-äthylamide = Cinchocaine lagen als Hydrochloride vor⁺⁾ . Die Badkonzentration der verwendeten Wirkstofflösungen sind in Tab. 3 aufgeführt.

Enantiomere N-(Aminoacyl)-ephedrine wurden nach dem Anhydrid-Verfahren synthetisiert. Über die Methode der Darstellung, Schmelzpunkt, Drehwinkel und Verteilungsverhalten dieser Verbindungen ist bereits berichtet worden (65, 92).

II. Enantiomere N-(Aminoacyl)-2, 6-dimethylaniline

1. Synthese

1a) N-(D-N-Dimethylalaninyl)-2, 6-dimethylanilin

Zu 4, 7 g (0, 04 Mol) D-N-Dimethylalanin (93), 4, 0 g (0, 04 Mol) Triäthylamin und 24 ml Chloroform gibt man bei 0° unter Rühren tropfenweise 4, 3 g (0, 04 Mol) Chlorameisensäureäthylester. Man rührt 15 Min. weiter und läßt dann 4, 8 g (0, 04 Mol) 2, 6-Dimethylanilin zufließen. Nach 48stdg. Stehen bei Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch mit einer 20proz. Natriumhydrogencarbonatlösung ausgeschüttelt. Das organische Lösungsmittel wird i. Vak. abgezogen, der ölige Rückstand in 2 n HCl aufgenommen und die Lösung mit Äther extrahiert. Man alkalisiert die wässrige Phase mit 2 n NaOH, nimmt die Base in Chloroform auf und versetzt die mit wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknete organische Phase mit HCl-Äther. Der Abdampfrückstand wird aus Methanol/Äther umkristallisiert. Hydrochlorid: farblose Kristalle, Ausbeute 2, 8 g (32% d. Th.), Schmp. 197° [α]_D²⁰ -23, 2° (c=1, 0, H₂O) (Zur Methodik vgl. (94)).

C ₁₃ H ₂₀ N ₂ O · HCl (256, 5)	Ber.: C 60, 86 H 8, 18 N 10, 92
	Gef.: C 60, 52 H 8, 24 N 10, 84

⁺⁾ Wir danken Herrn Prof. Dr. J. Büchl für die freundliche Überlassung der Substanzen.

1b) N-(L-N-Dimethylalanyl)-2, 6-dimethylanilin

Die Darstellung erfolgte entsprechend Verbindung 1a. Hydrochlorid: farblose Kristalle, Ausbeute 2, 7 g (30 % d. Th.), Schmp. 197° (Methanol/Äther), $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 23, 2$ ($c = 0, 5, \text{H}_2\text{O}$).

$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O} \cdot \text{HCl}$ (256, 5)	Ber.: C 60, 86	H 8, 18	N 10, 92
	Gef.: C 60, 27	H 7, 81	N 10, 99

2a) N-(D-N-Dimethylphenylalanyl)-2, 6-dimethylanilin

Die Darstellung erfolgte entsprechend Verbindung 1a aus 3, 9 g (0, 02 Mol) D-N-Dimethylphenylalanin, 2, 0 g (0, 02 Mol) Triäthylamin, 2, 2 g (0, 02 Mol) Chlorameisensäureäthylester und 2, 4 g (0, 02 Mol) 2, 6-Dimethylanilin. Hydrochlorid: farblose Kristalle, Ausbeute 2, 0 g (34% d. Th.), Schmp. 214° (Methanol/Äther), $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 94, 7^{\circ}$ ($c = 0, 5, \text{H}_2\text{O}$).

$\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O} \cdot \text{HCl}$ (332, 6)	Ber.: C 68, 60	H 7, 51	N 8, 41
	Gef.: C 68, 24	H 7, 50	N 8, 67

2b) N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-2, 6-dimethylanilin

Die Darstellung erfolgte entsprechend Verbindung 2a. Hydrochlorid: farblose Kristalle, Ausbeute 1, 8 g (29 % d. Th.), Schmp. 211° (Methanol/Äther), $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 93, 7^{\circ}$ ($c = 0, 5, \text{H}_2\text{O}$).

$\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O} \cdot \text{HCl}$ (332, 6)	Ber.: C 68, 60	H 7, 51	N 8, 41
	Gef.: C 68, 96	H 7, 64	N 8, 51

2. Prüfung der chemischen Stabilität in wäßriger Lösung

Um eine Verfälschung der Versuchsergebnisse durch hydrolytische Spaltung der Testsubstanzen unter den Bedingungen der biologischen Prüfung auszuschließen, wurde die Stabilität wäßriger Lösungen der rac. N-(Aminoacyl)-2, 6-dimethylaniline untersucht. Ähnliche Haltbarkeitsprüfungen wurden von FUCHSBERGER (29) bei N-(Aminoacyl)-ephedrinen durchgeführt.

Tabelle 17: Hydrolyse 0,2%iger N-(Aminoacyl)-2,6-dimethylanilin-Lösungen bei Hitzesterilisation (120°C, 20 Min.)

Ausgangsverbindung	pH von der Sterilisation	pH nach der Sterilisation	Hydrolyse [%]
N-(D, L-N-Dimethylalanyl)-2,6-dimethylanilin (1a, 1b)	1,20	1,10	-
	2,15	2,10	0,04
	4,90	4,75	-
	7,00	7,00	0,06
	12,50	12,35	0,12
N-(D, L-N-Dimethylphenylalanyl)-2,6-dimethylanilin (2a, 2b)	1,20	1,20	0,06
	2,15	2,15	0,12
	4,50	4,65	0,04
	6,90	6,85	-
	12,15	12,25	0,03

Methodik:

0,2%ige Lösungen der rac. N-(Aminoacyl)-2,6-dimethylanilin-hydrochloride wurden einer 20 Min. Dampfsterilisation (DAB 7) unterworfen (2 ml Ampullen). Als Spaltprodukt wurde 2,6-Dimethylanilin nach BULLOCK und GRUNDY (95) bestimmt. Die hydrolytische Spaltung der Verbindungen lag unter 0,1%. Auch Lösungen von pH 1,2 und 12,5 zeigten bei der Sterilisation keine nennenswerte Zersetzung. Der pH der Lösung wurde zur Kontrolle vor und nach der Hitzebehandlung gemessen. Zur Bestimmung wurde 1 ml des Ampulleninhaltes verwendet; die Extinktion wurde im Zeiß-Spektralphotometer PMQ II unter Verwendung von 1cm Küvetten bei 540 nm gemessen.

3. Bestimmung der Oberflächenaktivität

Die salzsauren Salze der rac. N-(Aminoacyl)-2,6-dimethylaniline wurden bei verschiedenen pH-Werten und Konzentrationen vermessen. Von jedem Versuchsstoff stellten wir eine Stammlösung her. Als Lösungsmittel verwendeten wir Froschringlösung. Verdünnungsreihen wurden, wie in Abb. 53 u. 54 angegeben, hergestellt. Von jeder Konzentration wurden Messungen durchgeführt bis die Werte 5 aufeinanderfolgender Bestimmungen nicht mehr als $\pm 0,2$ Einheiten differierten. Die Bestimmung der Oberflächenspannung erfolgte mit dem Interfacial-Tensiometer nach LECOMTE DU NOÛY (Modell K 8600, Firma A. Krüss, Hamburg) durch Messung des Widerstandes, den die Lösungen einer Vergrößerung ihrer Oberflächen beim Herausheben eines eintauchenden benetzten Platinringes entgegensetzten. Das Gerät erlaubt es die Oberflächenspannung direkt in dyn/cm abzulesen. Meßtemperatur: $t = 20 - 21^{\circ}\text{C}$.

4. Bestimmung des Verteilungskoeffizienten (96)

Als Lösungsmittelsystem kam zur Anwendung: 0,1 m Citratpuffer-Methanol-Chloroform (9 : 1 : 10 Vol.-%). Der pH-Wert der wäßrigen Phase wurde in einem Bereich von 2,5 bis 7,0 variiert. Die Bestimmung der extrem niederen ($K < 0,5$) und hohen ($K > 15$) K-Werte erfolgte bei verändertem Volumenverhältnis V (Variation $V_{\text{org}}/V_{\text{wäßr}}$ zwischen 5 und 0,2). $V = V_{\text{org}}/V_{\text{wäßr}}$ (I)

Die Bedingungen wurden dabei so gewählt, daß die Verteilungszahl G [$G = K \times V$ (II)] in einem Bereich von 0,5 bis 15 lag. Die Berechnung der K-Werte erfolgte nach Gleichung II.

Zur Bestimmung des N-(Aminoacyl)-2,6-dimethylanilins in der Ober- und Unterphase des Lösungsmittelsystems wurde die entsprechende Lösungsmittelschicht mit 2n NaOH alkalisiert und mit etwa 25 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die quantitative Ermittlung des Amins erfolgte in der Chloroform-Phase mit 0,01 n p-Toluolsulfonsäure (Indikator: Dimethylaminoazobenzol (97)). Die in Abb. 52 aufgeführten K-Werte ergeben sich aus mindestens 3 - 5 Einzelbestimmungen.

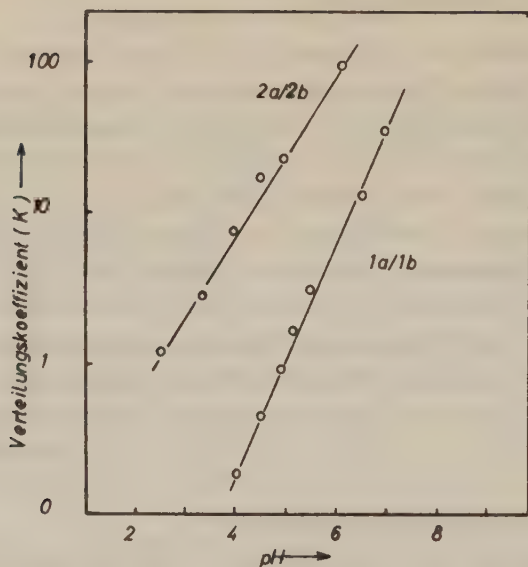


Abb. 52: Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten K vom pH der wässrigen Phase bei N-(Aminoacyl)-2,6-dimethylanilinen. Lösungsmittelsystem Chloroform-Methanol-Puffer (10 : 1 : 9 Vol. -T.)

1a/1b = N-(D, L-N-Dimethylalanyl)-2,6-dimethylanilin

2a/2b = N-(D, L-N-Dimethylphenylalanyl)-2,6-dimethylanilin

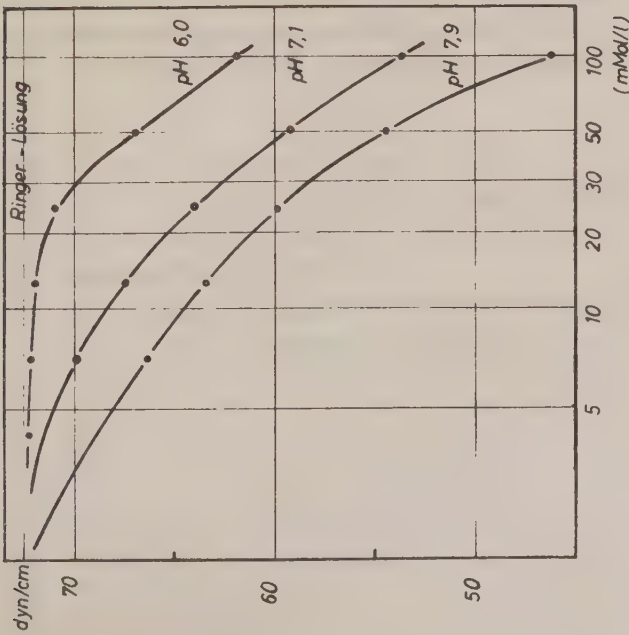


Abb. 53: Oberflächenspannung von N-(D, L-N-Dimethylalanyl)-2, 6-dimethylanilin (1a/1b) bei verschiedenen pH-Werten

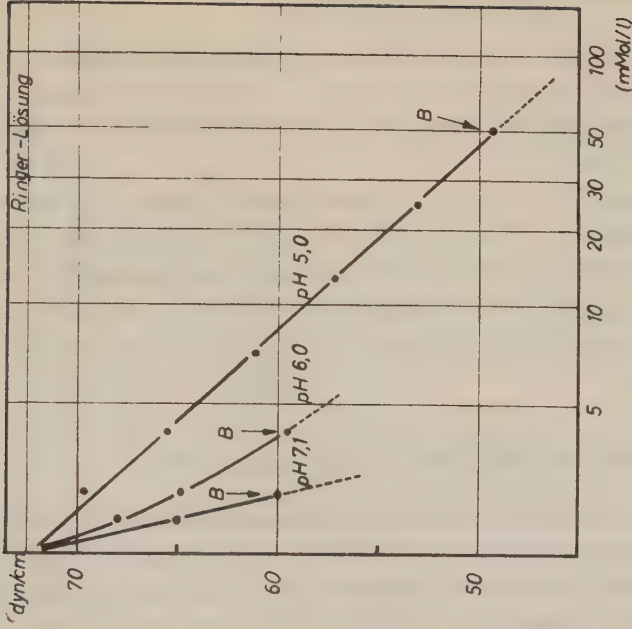


Abb. 54: Oberflächenspannung von N-(D, L-N-Dimethylphenylalanyl)-2, 6-dimethylanilin (2a/2b) bei verschiedenen pH-Werten
B↓: Ausfällung der Base

5. Bestimmung der Dissoziationskonstanten

Zur Bestimmung der scheinbaren Dissoziationskonstante ($p'K_a$) wurde die Wasserstoffionenkonzentration der mit CO_2 -freier 0,1 n KOH zur Hälfte neutralisierten Lösung der entsprechenden Verbindung aus der elektrometrischen Titrationskurve graphisch ermittelt.

Die Messungen wurden an $0,1 \times 10^{-3}$ molaren wäßrigen Lösungen unter Rühren und N_2 -Begasung bei $19 \pm 1^\circ$ mit dem Gerät Titrator TTT 1-Radiometer unter Verwendung einer Glaselektrode und einer Kalomel-Elektrode als Bezugslektrode durchgeführt. Die automatische Registrierung der Titrationskurven erfolgte mit der Geräteanordnung Titrigraph SBR 2, Titrator TTT 1 und Autobürette ABU 1 der Firma Radiometer.

6. Bestimmung des Trübungs-pH und der Wasserlöslichkeit

Die Bestimmung des Trübungs-pH und der Wasserlöslichkeit erfolgte nach J. BÜCHI et al. (67). Die Löslichkeit der Basen in Wasser wurde aus dem Trübungs-pH und dem $p'K_a$ -Wert berechnet. Die Meßanordnung war die gleiche wie die zur Bestimmung des $p'K_a$ -Wertes. Die mit KCl auf eine Ionenstärke von $\mu = 0,1$ eingestellte Lösung wurde unter N_2 -Begasung und Rühren mit CO_2 -freier 0,1 n KOH bis zur Trübung titriert ($t = 20^\circ C$). Von jeder Konzentration wurden 3 Bestimmungen durchgeführt. In Tab. 18 sind die Mittelwerte dieser Versuche eingetragen.

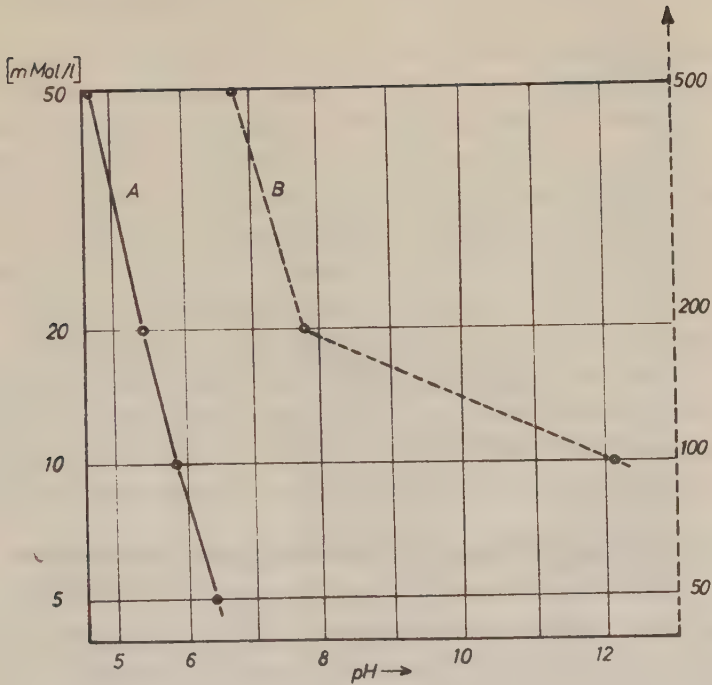


Abb. 55: Gesamtwasserlöslichkeit ($BH^{\oplus} + B$) der N-(Aminoacyl)-2,6-dimethylaniline in Abhängigkeit vom pH und der Konzentration bei 22°C. Höchste Konzentration bei den pH-Werten, bei denen sich die freien Basen eben abzuschcheiden beginnen.

Kurve A: N-(D, L-N-Dimethylphenylalanyl)-2,6-dimethylanilin
 Kurve B: N-(D, L-N-Dimethylalanyl)-2,6-dimethylanilin

Tabelle 18: Trübungs-pH und berechnete Basenlöslichkeit der Diastereomeren in Abhängigkeit von der Konzentration

Verbindung	Konzentration der Ausgangs- lösung [mmol/l]	Trübungs- pH	Wasserlöslichkeit der Base beim Trübungs-pH [mmol/l]	Basen- löslichkeit (Durchschnitts- wert) [mmol/l]
1a) N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-D-ephedrin (LD)	50	6, 57	4, 08	3, 81
	20	6, 97	4, 11	
	10	7, 30	3, 51	
	5	8, 01	3, 55	
2a) N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-L-ephedrin (LL)	50	5, 92	1, 29	1, 41
	20	6, 36	1, 36	
	10	6, 65	1, 23	
	5	7, 25	1, 77	
3a) N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-D-ψ-ephedrin (LDψ)	50	6, 37	3, 54	3, 75
	20	6, 78	3, 94	
	10	2, 32	4, 00	
	5	7, 90	3, 51	
4a) N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-L-ψ-ephedrin (LLψ)	50	6, 20	3, 00	3, 68
	20	6, 82	4, 14	
	10	7, 30	4, 38	
	5	7, 68	3, 22	

III. Synthese diastereomerer N-(Aminoacyl)-ephedrine nach dem Anhydrid-Verfahren (Standardansatz)

Die Suspension von 0,03 Mol N-D, L-Dimethylphenylalanin in 80 ml absol. THF wird mit 0,03 Mol Triäthylamin versetzt. Man kühlt im Kryomath auf -15°C ab und läßt unter kräftigem Rühren 0,03 Mol Chlorameisensäureäthylester hinzufließen. Der Reaktionsansatz wird noch 4 Std. weiter gerührt. Nach Zugabe von 0,03 Mol L(+) Ψ Ephedrin-Base in 20 ml THF rührt man 15 Min. bei -15°C , nimmt dann den Dreihalskolben aus dem Kältebad und rührt noch weitere 2 Std. bei Raumtemperatur. Anschliessend zieht man das THF am Rotationsverdampfer ab, gibt 20 ml 3n NaOH hinzu und extrahiert den Rückstand 3mal mit Äther. Die Ätherphase wird 3mal mit 8n HCl ausgeschüttelt und das Basengemisch in der Wasserphase nach Zugabe von 3n NaOH in Chloroform aufgenommen. Nach Trocknen mit Na_2SO_4 und Abziehen des Lösungsmittels wird ein aliquoter Teil (er enthält DL Ψ , LL Ψ und Ψ Ephedrin) einer 120stufigen Craigverteilung unterworfen. Die Ätherphase der salzsauren Ausschüttelung enthält N-Carbäthoxyephedrin, das durch Abdampfen gravimetrisch bestimmt wird.

1. Spektralphotometrische Bestimmung von N-(D, L-N-Dimethylphenylalanyl)-carbäthoxyanhydrid

Zur quantitativen Bestimmung des Anhydrids wird der -15°C kalte Reaktionsansatz durch eine Glasfilternutsche rasch i. Vac. in ein 100 ml Meßkölbchen, das in die Kühlsole eingetaucht ist, filtriert. Der Filtrerrückstand, bestehend aus Triäthylaminhydrochlorid, dem Addukt aus Chlorester und Triäthylamin und nicht umgesetztem N-Dimethylphenylalanin, wird mit kaltem THF (-15°C) nachgewaschen. Es wird auf 100ml mit kaltem THF aufgefüllt und bei -15°C in der Kühlsole belassen.

Für die spektralphotometrische Bestimmung wird von der klaren, hellgelben Anhydridlösung 1ml abpipettiert. Man läßt dann die Anhydridlösung in ein mit 25 ml H_2O und 0,2 ml n HCl gefülltes Rundkölbchen einfließen. Unter leichtem Schwenken der Flüssigkeit geht das ölig ausgefallene Anhydrid in Lösung. Man zieht am Rotationsverdampfer das THF ab, gibt die wäßrige Lösung in ein Meßkölbchen und füllt auf 100 ml auf. Diese Lösung wird bei 257 nm am BECKMANN-Spektralphotometer DK₂ unter Verwendung von 1ccm Quarzküvetten bestimmt. In Einzelfällen wurde zu Kontrollzwecken der vom THF befreite Filtrerrückstand in H_2O aufgenommen und vermessen. Die Anwesenheit von Triäthylamin zeigt keinen Einfluß auf das Spektrum. Zur Aufstellung der Eichge-

raden wurden von einer 1%igen wäßrigen Stammlösung von N-Dimethylphenylalanin, der 1 ml n HCl zugesetzt wurde, Lösungen abgestufter Konzentrationen hergestellt. Die Wahl der Konzentrationen erfolgte so, daß die Meßwerte die Grenzen $0,1 < E < 0,9$ nicht überschritten.

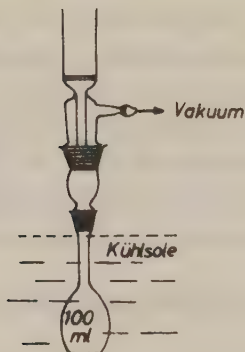


Abb. 56: Versuchsanordnung zur Filtration der Anhydridlösung

2. Craig-Verteilung

Die Auftrennung des Rohproduktgemisches erfolgte in einer automatischen Verteilungsbatterie mit 200 Elementen und je 25ml Unterphase Fassungsvermögen. Zur analytischen Verteilung wurden ca. 200 mg eingesetzt. System 0,1m Citratpuffer (pH 4,5)/Methanol/Chloroform 9:1:10 Vol.Tle. Der Gehalt der einzelnen Elemente wurde aminometrisch nach einer von R. Dietzel u. W. PAUL (97) angegebenen Methode bestimmt.

3. Bezugssubstanzen für die Dünnschichtchromatographie

1. N-(Carbäthoxy)- ψ -ephedrin

Die Isolierung und Reinigung der Substanz ist bereits beschrieben (56).

2. N-Dimethylphenylalanyläthylester

In die Suspension von 10g N-Dimethylphenylalanin in 100 ml Äthanol wird unter gelindem Erwärmen HCl-Gas bis zur Sättigung eingeleitet. Zum Entfernen des Reaktionswassers wird abgedampft und der Vorgang nach Zugabe von Alkohol wiederholt. Nach Abziehen des Alkohols i. Vak. verbleibt eine sirupöse Masse des Esterhydrochlorids. Das Produkt wird in der Eiskälte in wenig H_2O aufgenommen, mit 25%iger NaOH und K_2CO_3 versetzt. Anschließend wird die freie Esterbase in Chloroform aufgenommen, mit Na_2SO_4 sicc. getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. abgedampft. Destillation am Hochvakuum, Sdp. $0,04$ 93° , hellgelbes Öl, Ausbeute 46% d. Th.

Schmp. Hydrochlorid $93-96^\circ$ (Äther) weiße Kristalle

$C_{13}H_{20}NO_2 \cdot HCl$ (257,7)	Ber.: C 60,60	H 7,82	N 5,45
	Gef.: C 60,06	H 7,65	N 5,40

4. Kinetische Versuche

0,01 Mol N-D, L-Dimethylphenylalanin wurden in 80 ml absol. THF suspendiert, mit 0,01 Mol Triäthylamin versetzt und auf $-30^\circ C$ im Kryomat abgekühlt. Die Herstellung des gemischten Anhydrids durch Zugabe von 0,01 Mol Chlorameisensäureäthylester und die quantitative Bestimmung erfolgte in der oben angegebenen Weise. Die zur Aminolyse verwendete Menge L (+) ψ Ephedrin errechnete sich aus dem Prozentgehalt der Anhydridlösung. Die äquimolare Menge L (+) ψ Ephedrin wurde in 20ml absol. THF gelöst und auf $-30^\circ C$ abgekühlt. Die Umsetzung wurde durch Zugabe des Amins in einem Guß unter kräftigem Rühren gestartet. Zum vorgesehenen Zeitpunkt ließ man zur Unterbrechung der Reaktion 20 ml n HCl zufließen. Danach wurde am Rotationsverdampfer vom THF abdestilliert, die wäßrige salzsaure Phase 3mal mit Chloroform ausgeschüttelt und die organische Phase mit Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und in ein gewogenes Kölbchen übergeführt. Nach Abziehen von Chloroform i. Vak. wurde der rasch kristallisierende Rückstand im Vakuum-Exsiccator bis zur Ge-

wichtskonstanz getrocknet (Urethan). Die zurückgebliebene wäßrige Phase wurde mit 3 n NaOH alkalisiert und analog aufgearbeitet (Rohproduktgemisch).

Zur Trennung und quantitativen Bestimmung wurde ein Aliquot des Rohproduktes einer 120 stufigen Craigverteilung unterworfen.

Tabelle 19: Untersuchungen zum Einfluß der Aminolyse auf das Diastereomerenverhältnis DL ψ : LL ψ und den Gesamtumsatz von L- ψ -Ephedrin mit optisch aktivem Anhydrid bei -30°C.

Dauer der Aminolyse [Min.]		% Ausbeute			Gesamtumsatz [%]	Diastereomeren-Quotient DL ψ : LL ψ (Mittelwert)
		Amid	N-(Carbäthoxy)- ψ -ephedrin	L- ψ -Ephedrin		
1	D-	9,6	30,0	57,3	39,6	5,84 : 1
	L-	8,5	31,0	58,1	39,5	
3		1,5	39,4	56,0	40,9	4,61 : 1
		1,6	39,9	56,2	41,5	
	D-	15,3	31,7	52,1	47,0	
	L-	18,8	30,2	49,8	49,0	
5		2,8	44,4	46,0	47,2	2,49 : 1
		4,6	45,6	42,1	50,2	
		19,4	42,8	35,7	62,2	
	D-	17,3	41,6	39,8	58,9	
	L-	23,9	39,0	34,1	62,9	
15		8,2	57,9	32,2	66,1	1,81 : 1
		8,1	47,7	41,0	55,8	
	D-	22,7	45,2	30,2	67,9	
	L-	22,2	44,1	30,5	66,3	
30		10,4	66,0	20,5	76,4	2,10 : 1
		14,2	62,0	21,2	76,2	
	D-	29,9	48,4	18,9	78,3	
		28,5	45,3	23,9	73,8	
	L-	10,2	69,2	17,4	79,4	
		17,9	67,5	12,2	85,0	

G. Zusammenfassung

Durch die unterschiedliche Wirkung enantiomerer N-(Aminoacyl)-2,6-dimethylaniline und N-(Aminoacyl)-ephedrine auf die Erregungsleitung des Ventrikelstreifens (Froschherz) wird der Nachweis asymmetrisch gebauter Membranstrukturen als Wirkort von Lokalanästhetika erbracht. Dieses Ergebnis wird durch das Fehlen von Zusammenhängen zwischen physikalisch-chemischen Eigenschaften und Wirkung bei diastereomeren N-(Aminoacyl)-ephedrinen gestützt. Das Nichtvorhandensein solcher Beziehungen bei diastereomeren Verbindungen wird auf die unterschiedliche räumliche Anordnung der verknüpfenden Zentren zurückgeführt. Bei homologen Cinchocainen konnte ein solches symbates Verhalten als Ausdruck steigender hydrophober Bindungskräfte nachgewiesen werden. Die Feststellung, daß enantiomere Lokalanästhetika als unspezifische Pharmaka zum Teil beachtliche Wirkungsunterschiede zeigen, führte zu einer Modifizierung der PFEIFFER-Regel.

Durch Testung stereoisomerer Lokalanästhetika als freie und protonisierte Basen unter Verwendung des Ventrikelstreifens als Testobjekt - er besitzt keine störenden Diffusionsbarrieren - konnten tiefere Einblicke über die Bedeutung der verschiedenen Molekülgruppierungen bei der Verknüpfung mit Membranstrukturen erzielt und darüberhinaus die Frage nach der Wirkform der Lokalanästhetika (Ion oder Base) geklärt werden. Bei den therapeutisch gebräuchlichen Lokalanästhetika ist die protonisierte Base als Wirkform anzusehen. Lokalanästhetika, die über zwei aromatische Reste verfügen, wirken unter geeigneten sterischen Verhältnissen auch als Base. In der Verbindungsklasse der N-(Aminoacyl)-2,6-dimethylaniline lassen sich Wirkungsabstufungen mit dem Ausfall verknüpfender Molekülgruppierungen erklären.

Die Befunde zeigen weiterhin, daß die Verknüpfung der Lokalanästhetika mit Membranstrukturen über eine Mehrpunktebeziehung, d.h. über eine Ionenbeziehung und über hydrophobe Bindungen erfolgt. Die hydrophobe Wechselwirkung spielt dabei eine dominierende Rolle, sie kann die Ionenbeziehung beim Vorhandensein von mindestens zwei verknüpfenden Zentren völlig ersetzen.

Bei den N-(Aminoacyl)-ephedrinen waren die im Aminosäureanteil D-konfigurierten Isomeren in der überwiegenden Zahl der Fälle wirksamer. Eine wesentliche Bedeutung bei der Verknüpfung mit spezifischen Membranstrukturen besitzt der

Aminosäurerest des Moleküls; bei N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-L-ephedrin und N-(D-N-Dimethylphenylalanyl)-L-ephedrin überwiegt der Einfluß des L-Ephedrin-Anteils. Die enantiomeren Ionen und Basen zeigen wesentliche Wirkungsunterschiede, dabei zeichnen sich die Basen in allen Fällen durch eine stärkere Hemmung der Leitungsgeschwindigkeit aus. N-(N-Dimethylphenylalanyl)-ephedrin-Basen sind in der Lage durch Einstellung optimaler Konformationen eine für das Auftreten der leitungshemmenden Wirkung erforderliche Mehrpunktebeziehung zum Rezeptor einzugehen. Dieser Vorgang drückt sich auch in einer unterschiedlichen Reihenfolge bezüglich der Wirkungsabstufung bei Basen und Ionen aus.

Die Untersuchung eines Antipodenpaares aus der Reihe der N-(Aminoacyl)-ephedrine am isolierten Ranvierschen Schnürring ergab eine Hemmung der Na⁺-Leitfähigkeit. Die geprüften Verbindungen wirken weiterhin Veratridin-antagonistisch, indem sie die stationäre Erhöhung der Na⁺-Leitfähigkeit während der Veratridin-Vergiftung rückgängig machen.

Es wurden quantitative Untersuchungen zur Herstellung der N-(Aminoacyl)-ephedrine nach dem Anhydrid-Verfahren durchgeführt.

Ihre Bildung erfolgt in niedrigen Ausbeuten; durch eine bevorzugte Reaktion am "falschen" Carbonyl-C-Atom im gemischten Anhydrid wird die Bildung von N-(Carbäthoxy)-L-ψ-ephedrin begünstigt. Die Aminolyse des rac. Mischanhydrids mit L-ψ-Ephedrin verläuft stereoselektiv. Eine schnellere Bildung von N-(D-Dimethylphenylalanyl)-L-ψ-ephedrin konnte sowohl bei der Umsetzung von racemischen als auch von optisch aktivem Anhydrid nachgewiesen werden. Es wurde weiter festgestellt, daß bei Aminolyse des rac. Anhydrids zu allen Reaktionszeiten ein nahezu konstantes Diastereomerenverhältnis, N-(D-N-Dimethylphenylalanyl)-L-ψ-ephedrin - N-(L-N-Dimethylphenylalanyl)-L-ψ-ephedrin, von 2 : 1 auftritt.

H. Literaturverzeichnis

- 1) Zipf, H. F., Pharm. Acta Helv. 42, 480 (1967)
- 2) Watson, P. J., J. Pharm. Pharmacol. 12, 257 (1960)
- 3) Wiedling, S. u. Tegner, C. Progr. Medicin. Chem. 3, 332 (1968)
- 4) Truant, A. P. u. Takman, B., Drill's Pharmacology in Medicine, New York, 1965
- 5) Shanes, A. M., Pharmacol. Rev. 10, 59 (1958)
- 6) Nachmansohn, D., Chemical and molecular basis of nerve activity, Academic Press, New York, 1959
- 7) Changeux, J.-P., Abstracts, Fourth Internat. Congress on Pharmacology, Basel 1969, S. 7
- 8) Ryman, B. E. u. Walsh, E. O. F., J. Pharm. Pharmacol. 7, 341 (1955)
- 9) Kalyanpur, S. G. u. Ryman, B. E., Biochem. Pharmacol. 15, 691 (1966)
- 10) Holland, W. C., Klein, R. L. u. Briggs, A. H., Molekulare Pharmakologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1967, S. 164
- 11) Rapp, G. W., Arch. Biochem. 12, 13 (1947)
- 12) Stämpfli, R., Pharm. Acta Helv. 42, 465 (1967)
- 13) Hodgkin, A. L., Angew. Chem. 76, 661 (1964)
- 14) Huxley, A. F., Angew. Chem. 76, 668 (1964)
- 15) Eccles, J. C., Angew. Chem. 76, 674 (1964)
- 16) Schönenberger, H., Petter, A. u. Zvez, W., Mitt. Dtsch. Pharmaz. Ges. 38, 209 (1968)
- 17) Franck, U. F., Ber. Bunsenges. Physik. Chem. 71, 789 (1967)
- 18) v. Muralt, A., Neue Ergebnisse der Nervenphysiologie, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen, Heidelberg, 1958
- 19) Hodgkin, A. L. u. Keynes, R. D., J. Physiol. 128, 28 (1955)
- 20) Meves, H., Experientia 19, 377 (1963)
- 21) Ritchie, J. M. u. Greengard, P., Annu. Rev. Pharmacol. 6, 405 (1966)
- 22) Keynes, R. D., Protoplasma 63, 13 (1967)
- 23) Hille, B., Nature 210, 1220 (1966)
- 24) Skou, J. Chr., J. Pharm. Pharmacol. 13, 204 (1961)
- 25) Mueller, P. u. Rudin, O., J. Theoret. Biol. 268 (1963) u. Nature, 11, 603 (1967)
- 26) Stoeckenius, W., Ber. Bunsenges. Physik. Chem. 71, 758 (1967)
- 27) Schmid, G., Ber. Bunsenges. Physik. Chem. 71, 778 (1967)

- 28) Mueller, P. u. Rudin, O., Biochem.Biophys.Res.Communications 26, 398 (1967)
- 29) Fuchsberger, K.-D., Dissertation Universität München, 1966
- 30) Perlia, X., Pharm.Acta Helv. 42, 517 (1967)
- 31) Büchi, J. u. Perlia, X., Beziehungen zwischen den physikalisch-chemischen Eigenschaften und der Wirkung von Lokalanästhetica, Editio Cantor KG, Aulendorf i. Württ. 1962
- 32) Büchi, J., Perlia, X. u. Strässle, A., Arzneimittel-Forsch. 16, 1657 (1966)
- 33) Ritchie, J.M. u. Ritchie, B.R., Science 162, 1394 (1968)
- 34) Strobel, G.E. u. Bianchi, C.P., J. Pharmacol. Exp. Ther. 172, 1 (1970)
- 35) Karlson, P., Lehrbuch d. Biochemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1970
- 36) Korn, E.D., Science 153, 1491 (1966)
- 37) Wallach, D.F. u. Gordon, A., Feder. Proc. 27, 1263 (1968)
- 38) Ellice, R.M. u. Metcalfe, J.C., Abstracts, Fourth Internat. Congress on Pharmacology, Basel 1969, S. 91
- 39) McConnell, H.M., J.Gen.Physiol. 54, 277 s (1969)
- 40) McConnell, H.M., Abstracts, Fourth Internat. Congress on Pharmacology, Basel 1969, S. 518
- 41) Seeman, P., Biochem. Pharmacol. 15, 1753 (1966)
- 42) Easson, H.L. u. Stedman, E., Biochem. J. 27, 1257 (1933)
- 43) Herr, F., Arzneimittel-Forsch. 8, 137 (1958)
- 44) De Jong, R.H. u. Wagman, I.H., Anesthesiology 24, 684 (1963)
- 45) Schumacher-Marienfrid, Grundriß der Histologie des Menschen, Verlag J. Springer, Wien 1934
- 46) Beckett, A.H., Angew.Chem. 72, 686 (1960)
- 47) Bammer, H. u. Roths Schuh, K.E., Naunyn.-Schmiedebergs Arch. Pharmak. u. exp.Path. 214, 367 (1952)
- 48) Weidmann, S., J. Physiol. 127, 213 (1955)
- 49) Dudel, J. u. Rüdel, R., Pflügers Arch. ges. Physiol. 289, R 13 (1966)
- 50) Krause, H., Antoni, H. u. Fleckenstein, A., Pflügers Arch. ges. Physiol. 289, 12 (1966)
- 51) Weidmann, S., The Harvey Lectures, Series 61, 1 - 15, Academ. Press, New York 1967
- 52) Weidmann, S., Elektrophysiologie der Herzmuskelfaser, Medizinischer Verlag Hans Huber, Bern, Stuttgart 1956, S. 34

- 53) Sobotta, J., Atlas of Human Histology and Microscopy Anatomy, G.E. Stechert u. Co., New York 1930
- 54) Sjöstrand, F.S., Andersson-Cedergren, E. u. Dewey, M., J. Ultrastruct. Res. 1, 271 (1958)
- 55) Staley, N.A. u. Benson, E.S., J. Cell. biol. 38, 99 (1968)
- 56) Brinkmann, R., Dissertation Universität München 1964
- 57) Wiedling, S., Xylocaine, The Pharmacological basis of its clinical use, Almqvist u. Wiksell, Uppsala 1964
- 58) Löfgren, N., Studies on local anaesthetics, Xylocaine, a new synthetic drug, J. Hoeggström, Stockholm 1948
- 59) Scholtan, W., Arzneimittel-Forsch. 18, 505 (1968)
- 60) Büchi, J., Pharm. Acta Helv. 42, 534 (1967)
- 61) Miescher, K., Helv. chim. Acta 15, 163 (1932)
- 62) Büchi, J. u. Perlla, X., Arzneimittel-Forsch. 10, 554 (1960)
- 63) Büchi, J., Müller, K. u. Perlla, X., Arzneimittel-Forsch. 16, 1475 (1966)
- 64) Albert, A. u. Serjeant, E.P., Ionisations Constants of Acids and Bases, Methuen & Co. Ltd., London 1962
- 65) Schönenberger, H., Brinkmann, R. u. Bamann, E., Arch. Pharmacol. 296, 33 (1963)
- 66) Wehr, K.H. u. Koelzer, P.P., Arzneimittel-Forsch. 8, 88 (1958)
- 67) Büchi, J., Perlla, X. u. Studach, S.P., Arzneimittel-Forsch. 17, 1012 (1967)
- 68) Müller-Mohnssen, H. u. Balk, O., Naturwissenschaften 53, 130 (1966)
- 69) Schütz, E., Physiologie des Herzens, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1958, S. 110
- 70) Ariens, E.J., Advances in Drug Research, Academic Press, London, New York 1966
- 71) Büchi, J., Müller, K., Perlla, X. u. Preiswerk, M.A., Arzneimittel-Forsch. 16, 1263 (1966)
- 72) Némethy, G. u. Scheraga, H.A., J. Chem. Phys. 66, 1773 (1962)
- 73) Némethy, G., Angew. Chem. 79, 260 (1967)
- 74) Lovrien, R., J. Amer. chem. Soc. 85, 3677 (1963)
- 75) Markus, G., Love, R.L. u. Wissler, F.C., J. biol. Chemistry 239, 3687 (1964)
- 76) Anderson, B.M., Reynolds, M.L. u. Anderson, C.D., Biochim. biophys. Acta 99, 46 (1965)

- 77) Trautwein, W., *Ergebn. Physiol.* 51, 131 (1961)
- 78) Reichel, H., *Muskelphysiologie*, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1960
- 79) Meves, H. u. Voelkner, K.-G., *Pflügers Arch.ges.Physiol.* 265, 457 (1958)
- 80) Offner, F., Weinberg, A. u. Young, G., *Bull.math.Biophys.* 2, 89 (1940)
- 81) Drouin, H. u. The, R., *Pflügers Arch.* 313, 80 (1969)
- 82) Müller-Mohnssen, H., *Z. vergl. Physiol.* 52, 73 (1960)
- 83) Wishnia, A. u. Pinder jr. T.W., *Biochemistry* 5, 1534 (1966)
- 84) Boissier, J.R., Dumont, C. u. Malen, C., *Therapie* 12, 551 (1957)
- 85) Eckert, Th., Kilb, E. u. Hoffmann H., *Arch. Pharmac.* 297, 31 (1964)
- 86) Brandt, W., *Dissertation Universität München* 1969
- 87) Herlinger, H., Kleinmann H. u. Ugi, I., *Liebigs Ann.Chem.* 706, 37 (1967)
- 88) Endres, W., *Dissertation Universität München* 1969
- 89) Gerrard, W. u. Schild, F., *Chem. and Ind.* 40, 1232 (1954)
- 90) Anderson, G.W., Zimmermann, J.E. u. Callahan, F.M., *J.Amer.Chem.Soc.* 89, 5012 (1967)
- 91) Tarbell, D.S., *J. Org. Chem.* 26, 2161 (1961)
- 92) Schönenberger, H., Brinkmann, R. u. Bamann, E., *Arch. Pharmac.* 297, 721 (1964)
- 93) Houben-Weyl, *Handbuch der organ. Chemie*, Bd. 11/2 (1956) S. 330
- 94) Hollowood, J., *J.med.Chem.* 10, 863 (1967)
- 95) Bullock, K. u. Grundy, J., *J.Pharm.Pharmacol.* 7, 755 (1955)
- 96) Hecker, E., *Verteilungsverfahren im Laboratorium*, Verlag Chemie, Weinheim 1955, S. 20
- 97) Dietzel, R. u. Paul W., *Arch. Pharmac.* 273, 507 (1935)
- 98) Petter, A., *Habilitationsschrift*, Universität München, 1966
- 99) Wilson, J.B., *J.Biol.Chem.* 197, 215 (1952)
- 100) Stämpfli, R., *Helv.physiol.pharmacol. Acta* 16, 127 (1958)
- 101) Müller-Mohnssen, H., u. Balk, O., *Z.Biophysik* 2, 212 (1965)

Lebenslauf

Werner Joachim
Zwe z
geboren am 24.8.39 in Berlin als Sohn
des Verlegers Helmut Zwez und seiner
Ehefrau Julia, geb. Wagner

Schulbildung:
1945 Volksschule Starnberg a. See
1946-1949 Volksschule Mittenwald/Karw.
1949-1958 Oberrealschule Garmisch-Parten-
kirchen
Juli 1958 in Garmisch-Partenkirchen

Reifeprüfung:
Berufsausbildung:
1958-1960 Stern-Apotheke in Oberammergau

Praktikantenzeit:
Pharmazeutisches Vorexamen:
September 1960 in München

Wehrdienst:
Oktober 1960 - Dezember 1961 in Berchtesga-
den, Reichenhall und München

Berufsausbildung:
Studium der Pharmazie:
SS 1962 - WS 1965, Universität München

Pharmazeutisches Staatsexamen:
Mai 1965

Kandidatenzeit:
St. Lukas-Apotheke, Oberammergau
St. Antonius-Apotheke, Berchtesgaden
Römhild-Apotheke, Diessen/Ammersee
September 1966

Bestallung als Apotheker:
Wissenschaftliche Arbeit:
November 1965 - September 1970 unter Anlei-
tung von Herrn Professor Dr. H. Schönenberger
am Institut für Pharmazie und Lebensmittel-
chemie der Universität München, Direktor:
Prof. Dr. H.-D. Stachel

Berufliche Tätigkeit:
November 1967 - März 1968
Wissenschaftlicher Hilfsassistent, Institut
für Pharmazie und Lebensmittelchemie.
Seit April 1968 Verwalter einer wiss. Assstel-
le am Institut für Pharmakologie, Toxikologie
und Pharmazie der Tierärztl. Fakultät der
Universität München, Vorstand: Professor
Dr. K. Z i p f.

